

**Charakterisierung und Struktur einer
Hydroxy(phenyl)pyruvat Reduktase aus
*Coleus blumei***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Verena Dominique Janiak
aus
Remscheid

Marburg/Lahn 2007

If London is a spider's web, then where do I fit in?
Maybe I'm the fly.
I'm the fly.

(Martin Amis, *London Fields*)

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Petersen

Zweitgutachter: Dr. A. Heine

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	1
I	EINLEITUNG	2
1	<i>Coleus</i>	2
2	Rosmarinsäure	3
2.1	Biosynthese der Rosmarinsäure	5
2.2	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase	6
3	D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen	8
3.1	D-Laktat Dehydrogenasen	11
3.2	Hydroxypyruvat Reduktasen (D-Glycerat Dehydrogenasen)	12
3.3	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenasen (3-Phosphohydroxypyruvat Reduktasen)	15
3.4	D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenasen	17
3.5	Formiat Dehydrogenasen	17
3.6	Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenasen	18
4	Ziele dieser Arbeit	21
II	MATERIAL UND METHODEN	22
5	Proteinchemische Methoden	22
5.1	SDS-Polyacrylamid Gel	22
5.1.1	Herstellung von Trenn- und Sammelgel	22
5.1.2	Probenvorbereitung	23
5.1.3	Gelelektrophoresebedingungen	23
5.1.4	Coomassie Färbung	24
5.2	Proteinbestimmung	25
6	Allgemeine molekularbiologische Methoden	25
6.1	RNA-Isolierung	25
6.2	cDNA-Synthese	26
6.3	Agarose-Gelelektrophorese	27
6.4	DNA-Isolierung aus Agarosegel	28
6.4.1	NucleoTrap® Gel Extraction Kit	28
6.4.2	Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System	29
6.4.3	QIAquick® Gel Extraction Kit	29
6.5	Reinigung von DNA aus Verdau-Ansätzen oder PCR	30
6.5.1	NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel	30
6.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation	30

6.7	Anlegen einer Bakterien-Dauerkultur	31
6.8	Plasmidextraktion	32
6.8.1	“Quick and Dirty“	32
6.8.2	QIAGEN® Plasmid Kit mit QIAGEN-tip 20 Säulen	32
6.8.3	QIAprep® Miniprep Kit	33
6.9	Restriktionsverdau der Vektoren	34
6.9.1	pET-15b-Vektor	34
6.9.1.1	Verdau mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	34
6.9.1.2	Verdau mit <i>NdeI</i>	35
6.9.2	pET-24d-Vektor	35
6.10	DNA Sequenzierung	36
7	Klonierung der H(P)PR aus <i>Coleus</i> Zellkulturen	36
7.1	cDNA Synthese	36
7.2	Klonierung der H(P)PR-cDNA in den pET-15b-Vektor	36
7.2.1	PCR	36
7.2.2	Ligation in den pGem®T-Vektor	37
7.2.3	Transformation in <i>E. coli</i> JM109	38
7.2.4	Isolierung der H(P)PR-DNA aus dem pGem®T-Vektor	38
7.2.5	Ligation in den pET-15b-Vektor	39
7.2.6	Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	39
7.3	Klonierung der H(P)PR-cDNA in den pET-24d-Vektor	40
7.3.1	PCR	40
7.3.2	Verdau und Ligation in den pET-24d-Vektor	40
7.3.3	Transformation in TOP10 Zellen	41
7.3.4	Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	42
8	Klonierung der H(P)PR aus <i>Coleus blumei</i> Pflanzen	42
8.1	mRNA Isolierung und cDNA Synthese	42
8.2	H(P)PR aus <i>Coleus</i> M	42
8.2.1	PCR	42
8.2.2	Verdau	43
8.2.3	Ligation in den pET-15b-Vektor	43
8.3	H(P)PR aus <i>Coleus</i> V6	43
8.3.1	PCR	43
8.3.2	Verdau	43
8.3.3	Ligation in den pET-24d-Vektor	44
8.4	Transformation	44
9	Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
9.1	cDNA Synthese	44

9.2	PCR	44
9.3	Ligation in den pET-15b-Vektor	45
9.4	Transformation in JM109	46
9.5	Transformation in BL21(DE3)pLysS	46
10	Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus <i>Solanum melongena</i> (Aubergine) und <i>Capsicum annuum</i> (Paprika)	46
10.1	cDNA Synthese	46
10.2	PCR	46
10.3	Verdau und Ligation	47
10.4	Transformation	48
11	Induktion und Proteinreinigung	48
11.1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS Expressionsstamm	48
11.1.1	Induktion mit IPTG	50
11.2	Aufschluss der Bakterien	50
11.3	Aufreinigung des Proteins über Metallchelate-Chromatographie	51
11.3.1	Reinigung über eine Ni-NTA-Säule	51
11.3.2	Reinigung mit Hilfe des Ni-NTA Batchverfahrens	52
11.4	Reinigung über 2'5'-ADP-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech)	52
11.5	Abspaltung des His-Tags	53
12	Methoden zur Charakterisierung der H(P)PR	53
12.1	Enzymtest mit Auswertung über HPLC	53
12.1.1	HPLC-Analyse	54
12.2	Photometrischer Enzymtest	54
12.3	Größenausschlusschromatographie	55
12.4	Untersuchung der Chiralität des gebildeten pHPLs	56
13	Kristallographische Methoden	57
13.1	Aufbereiten der Proteinlösung	57
13.2	Kristallisation	58
13.2.1	Kristallisation des H(P)PR-Proteins	60
13.2.2	Kristallisation von H(P)PR mit NADP ⁺	60
13.3	Datensammlung und Auswertung	60
13.4	Strukturlösung und Verfeinerung	61
13.5	Docking	62
13.6	Protein Daten Bank Deponierungscode	63
III	ERGEBNISSE	64
14	H(P)PR und ähnliche Sequenzen	64
14.1	H(P)PR im pET-15b-Vektor	64

14.1.1	Sequenzvergleich der H(P)PR	65
14.2	Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
14.3	Klonierung zweier neuer H(P)PR-ähnlicher cDNAs aus Aubergine und Paprika	66
14.4	Vergleich der H(P)PR-Sequenzen aus einer Zellkultur und Pflanzen von <i>Coleus blumei</i>	69
15	Gewinnung des H(P)PR-Proteins	69
15.1	Bakterienkultur	69
15.2	Ni-NTA Affinitätschromatographie	69
15.3	Reinigung über 2'5'-ADP-Sepharose	70
15.4	Überprüfung der Reinheit der Proteinfractionen	71
16	Charakterisierung des heterolog exprimierten H(P)PR-Proteins	72
16.1	pH-Abhängigkeit	72
16.1.1	pH-Abhängigkeit in unterschiedlichen Puffern	72
16.1.2	pH-Abhängigkeit in Britton-Robinson Puffer	73
16.2	Temperaturabhängigkeit	73
16.3	Substratspezifitäten und K_m -Werte	74
16.3.1	Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH und NADH	76
16.3.2	Bestimmung der K_m -Werte für NADPH und NADH	77
16.3.3	Überblick über die Substrate	79
16.3.4	4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP)	79
16.3.5	Spezifische Aktivitäten mit Phenylpyruvat-Derivaten als Substrate	81
16.3.6	Pyruvat	82
16.3.7	Glyoxylat	84
16.3.8	Hydroxypyruvat	85
16.3.9	Oxoisocaproat	87
16.4	Untersuchung des Einflusses des His-Tag auf die Aktivität der H(P)PR	89
16.5	Größenausschlusschromatographie	90
16.6	Untersuchung zur Bildung von D- oder L-pHPL	92
17	Kristallstrukturanalyse	93
17.1	Kristallisation und Datensammlung	93
17.2	Strukturlösung und Verfeinerung	95
17.3	Kristallstruktur der H(P)PR	98
17.3.1	NADP ⁺ -Bindung in der Komplexstruktur	99
17.3.2	Dimer-Bildung	101
18	Docking von möglichen Substratstrukturen	101
IV	DISKUSSION	104
19	Sequenzen	104

19.1	Sequenzvergleich der H(P)PR	104
19.2	Neue cDNA-Sequenzen aus Solanaceen	104
19.3	H(P)PR-Sequenzen aus <i>Coleus blumei</i> Pflanzen	105
20	Charakterisierung der heterolog exprimierten H(P)PR	105
20.1	Proteinaufreinigung und Qualität der Proteinchargen	105
20.2	pH- und Temperaturabhängigkeit	106
20.3	Substratspezifität	106
20.3.1	Cosubstrat	107
20.3.2	Substrat	107
20.4	Struktur der H(P)PR	109
20.4.1	Allgemeiner Aufbau	109
20.4.2	Domänenbewegung und Katalyse	113
20.4.3	Dimer-Bildung	117
20.4.4	Katalytische Spalte der Komplexstruktur	119
20.4.5	Substrat-Bindungsmodelle	121
20.5	Substratdocking	123
20.6	Schlussfolgerung	124
V	ZUSAMMENFASSUNG	127
VI	SUMMARY	129
VII	REFERENZEN	131
VIII	ANHANG	141
A	Vektorkarten	141
A.1	pET-15b-Vektor	141
A.2	pET-24d-Vektor	142
A.3	pGem [®] -T-Vektor	143
B	Abkürzungen	144
C	Definitionen	151
D	Geräteliste	153
E	Chemikalienliste	154
	Danksagung	156
	Erklärung	157

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>Coleus blumei</i>	3
Abb. 2	Struktur der Rosmarinsäure	3
Abb. 3	Biosynthese der Rosmarinsäure	6
Abb. 4	Sequenzen der putativen H(P)PR	7/8
Abb. 5	Allgemeine Reaktion der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen	8
Abb. 6	Allgemeiner Aufbau der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen anhand der humanen Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase	9
Abb. 7	D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen in der InterPro Datenbank	10
Abb. 8	Oxidativer Kohlenstoffzyklus der Photorespiration in Blattperoxisomen	13
Abb. 9	Serin-Biosynthese in höheren Pflanzen	15
Abb. 10	Struktur der Phosphoglycerat Dehydrogenase aus <i>E. coli</i>	16
Abb. 11	Vitamin B6 Biosynthese in <i>E. coli</i>	19
Abb. 12	DXP-unabhängige Vitamin B6 Biosynthese	20
Abb. 13	Struktur der Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenase aus <i>P. aeruginosa</i>	21
Abb. 14	Regulierung der Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	49
Abb. 15	Schema der Histidin Bindung an die Ni-NTA Matrix	51
Abb. 16	Matrix der Chiralcel OD Säule	57
Abb. 17	Prinzipien der Kristallbildung	59
Abb. 18	Methode des hängenden und sitzenden Tropfens	59
Abb. 19	Agarosegel mit aufgetragener H(P)PR-PCR	64
Abb. 20	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der H(P)PR	65
Abb. 21	Nukleotidsequenzen von H(P)PR-ähnlichen cDNAs aus Aubergine und Paprika	67/68
Abb. 22	Vergleich der H(P)PR AS-Sequenz mit ähnlichen AS-Sequenzen aus Solanaceen	68
Abb. 23	Verlauf der Ni-NTA Affinitätsreinigung	70
Abb. 24	Verlauf der 2'5'-ADP-Sepharose Reinigung mittels FPLC	71
Abb. 25	SDS-Gel mit Fraktionen der Proteinreinigung	71
Abb. 26	pH-Abhängigkeit der H(P)PR bei 40°C mit unterschiedlichen Puffern	72
Abb. 27	pH-Abhängigkeit der H(P)PR bei 40°C in Britton-Robinson Puffer	73
Abb. 28	Temperaturabhängigkeit der H(P)PR	74
Abb. 29	Absorptionsspektren von NADPH und NADH	75
Abb. 30	Molarer Extinktionskoeffizient von NADPH	76
Abb. 31	Molarer Extinktionskoeffizient von NADH	76
Abb. 32a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der NADPH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat	77
Abb. 32b	Linearisierung der Daten aus Abb. 32a nach Lineweaver-Burk	77

Abb. 33a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der NADH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat	78
Abb. 33b	Linearisierung der Daten aus Abb. 33a nach Lineweaver-Burk	78
Abb. 34	Substanzen zur Überprüfung der Substratspezifität der H(P)PR	79
Abb. 35a	Abhängigkeit der spez. Aktivität von H(P)PR von der pHPP-Konzentration	80
Abb. 35b	Linearisierung der Daten aus Abb. 35a nach Lineweaver-Burk	80
Abb. 36	Molarer Extinktionskoeffizient von pHPP mit Extinktionsspektrum	81
Abb. 37	Spezifische Aktivitäten der H(P)PR mit Phenylpyruvaten als Substrate	82
Abb. 38	Molarer Extinktionskoeffizient von Pyruvat mit Extinktionsspektrum	82
Abb. 39a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Pyruvatkonzentration	83
Abb. 39b	Linearisierung der Daten aus Abb. 39a nach Lineweaver-Burk	83
Abb. 40	Extinktionsspektrum von Glyoxylat	84
Abb. 41a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Glyoxylatkonzentration	85
Abb. 41b	Linearisierung der Daten aus Abb. 41a nach Lineweaver-Burk	85
Abb. 42	Molarer Extinktionskoeffizient von Hydroxypyruvat mit Extinktionsspektrum	86
Abb. 43a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Hydroxypyruvatkonzentration	86
Abb. 43b	Linearisierung der Daten aus Abb. 43a nach Lineweaver-Burk	87
Abb. 44	Molarer Extinktionskoeffizient von Oxoisocaproat mit Extinktionsspektrum	88
Abb. 45a	Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Oxoisocaproatkonzentration	88
Abb. 45b	Linearisierung der Daten aus Abb. 44a nach Lineweaver-Burk	89
Abb. 46	Aktivitätsvergleich unterschiedlicher Enzymchargen der H(P)PR	90
Abb. 47	Eichgerade für die Größenausschlusschromatographie mit Standardproteinen	91
Abb. 48	Größenausschlusschromatographie mit Aktivitätsmessung der Fraktionen	91
Abb. 49a	Auftrennung von gebildetem pHPL und von D,L-pHPL über eine chirale HPLC-Säule	92
Abb. 49b	Auftrennung von L-pHPL über eine chirale HPLC-Säule	93
Abb. 50	Kristallcluster der heterolog exprimierten H(P)PR mit N-terminalem His-Tag	94
Abb. 51	Tetragonal-bipyramidale Kristalle der H(P)PR mit NADP ⁺ und pHPP	94
Abb. 52	Mit dem Programm Swiss-Model erstelltes Modell	96
Abb. 53a	Topologie-Diagramm der H(P)PR	98
Abb. 53b	H(P)PR-Monomer in der asymmetrischen Einheit	99
Abb. 54	3fo-2fc Elektronendichte um das Cosubstrat	100
Abb. 55	Wasserstoffbrücken des NADP ⁺ -Moleküls zum Protein	100
Abb. 56	Dimer der H(P)PR mit gebundenem NADP ⁺	101
Abb. 57	Bindungsmodus A und Bindungsmodus B für das Substrat pHPP	102

Abb. 58	Struktureller Aufbau der H(P)PR	110
Abb. 59	Überlagerung der H(P)PR mit verwandten Strukturen, getrennt in beide Domänen	112
Abb. 60	Überlagerung der nativen H(P)PR-Struktur mit der H(P)PR-Komplex-Struktur	114
Abb. 61	Überlagerung der Cosubstrat-Bindedomänen verwandter D-Isomer-spezifischer 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen	115
Abb. 62	Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen der nativen H(P)PR-Struktur	116
Abb. 63	Dimer der H(P)PR, Oberfläche berechnet mit Pymol	118
Abb. 64	Wechselwirkungen zwischen NADP^+ und der heterolog exprimierten H(P)PR	120
Abb. 65	Dichte im aktiven Zentrum in der Umgebung der Substrat-Bindestelle	120
Abb. 66	Substrat-Bindungsmodelle anhand der H(P)PR Komplexstruktur mit Pyruvat als Substrat	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Vorkommen von Rosmarinsäure im Pflanzenreich	4
Tab. 2	Statistiken des nativen und des NADP^+ -Komplex-Datensatzes der H(P)PR	95
Tab. 3	Für den molekularen Ersatz verwendete D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen	96
Tab. 4	Statistik der Verfeinerung der nativen Struktur und der Komplexstruktur mit NADP^+	97
Tab. 5	Übersicht über die Dockingergebnisse für fünf Substrate	103
Tab. 6	Apparente K_m -Werte der getesteten Substrate der H(P)PR	108
Tab. 7	Errechnete z-Werte mit dem Programm Dali zum strukturellen Vergleich der H(P)PR mit verwandten Proteinen	113

Vorwort

Als ich im Jahr 2002 mit meiner Doktorarbeit begann, wurde mir zur Aufgabe gestellt, ein Protein zu charakterisieren, welches durch ein Gen aus Zellkulturen von *Coleus blumei* codiert wird, das als putative Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) angesprochen wurde. Dieses Enzym sollte an der Biosynthese der Rosmarinsäure in Pflanzen beteiligt sein, indem es 4-Hydroxyphenylpyruvat zum entsprechenden Laktat reduziert.

Im Laufe der Charakterisierung zeigten sich Abweichungen zur nativen HPPR. Weiterhin konnte ich Hydroxypyruvat, ein Substrat, das dem 4-Hydroxyphenylpyruvat strukturell ähnlich ist, aber keinen Phenylring besitzt, als das am besten akzeptierte Substrat identifizieren.

Da ich dennoch nicht ausschließen kann, dass es sich bei dem heterolog exprimierten Enzym um die an der Rosmarinsäure Biosynthese beteiligte HPPR handelt, wird dieses Enzym in der vorliegenden Arbeit als H(P)PR bezeichnet. Dies soll bereits die in meiner Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Charakterisierung vorweg nehmen, und ich hoffe, dass diese Namensgebung zu keinerlei Verwirrungen führt.

Verena Janiak

I Einleitung

1 *Coleus*

Pflanzen der Gattung *Coleus*, die der Familie der Lamiaceae angehört, wurden erstmals 1851 aus Java, Indonesien, von dem holländischen Botaniker Willink in Europa eingeführt (Gardener, 1855). Die Gattung besteht aus mehr als 300 Spezies, die allesamt in tropischen und subtropischen Gebieten von Afrika, Australien, dem östlichen Indien, Malaysia und den Philippinen heimisch sind (Lebowitz, 1985). Vertreter dieser Gattung werden in einigen Kulturen als traditionelle Arzneimittel eingesetzt. So finden manche Arten als Dermatikum, Anthelminthikum, bei Herzproblemen, Koliken, Problemen der oberen Luftwege oder Schlaflosigkeit Anwendung (Ammon und Müller, 1985; de Souza und Shah, 1988). Ein wichtiger Vertreter, *C. forskohlii* Briq. (syn. *C. barbatus* Briq.), enthält das Labiaten-Diterpen Forskolin, das neben einer antihypertensiven Wirkung und eines positiv inotropen Effektes noch weitere pharmakologische Wirkungen zeigt, die von medizinischem Interesse sind (Lindner et al., 1978).

In Afrika und Asien werden Wurzelknollen und Blätter von *Coleus*-Arten als Nahrungsmittel genutzt (Lukhoba et al., 2006).

Der Name *Coleus* kommt aus dem Griechischen (*koleos* = Scheide) und beschreibt die bei dieser Gattung charakteristisch am Grunde verwachsenen Filamente (de Loureiro, 1790). Der Habitus der Pflanzen ist krautig und oft buschig mit kleinen, unauffälligen blau-violetten Blüten (Lebowitz, 1985).

Eine in Europa weit verbreitete, aber nicht natürlicherweise vorkommende Spezies ist *Coleus blumei* (Buntnessel). Diese ist wegen ihrer vielfältigen, meist bunt gefärbten Blätter oft in Häusern und Gärten als Zierpflanze anzutreffen. Die Pflanze ist eine natürliche Hybride. Ihr Genom wird als amphitetraploid (Lebowitz, 1985) oder tetraploid (Bennet und Leitch, 1995) beschrieben. Sie ist leicht über Stecklinge vermehrbar. Als wichtigster Sekundärinhaltsstoff kommt Rosmarinsäure mit Gehalten bis zu 9% vom Trockengewicht vor (eigene Untersuchungen). Zellkulturen dieser Pflanze werden zur Rosmarinsäureproduktion und in der Forschung genutzt (Petersen, 1994).

In der Literatur findet man einen uneinheitlichen Thesaurus. Die *GRIN* Datenbank des National Germplasm Resources Laboratory gibt folgende Synonyme an: *Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd, *C. blumei* var. *verschaffeltii* (Lem.) Lem., *C. hybridus* hort. ex

Voss, *C. pumilus* Blanco, *C. scutellarioides* (L.) Benth., *C. verschaffeltii* Lem., *Ocimum scutellarioides* L. (basionym) und *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.

Obwohl *S. scutellarioides* (L.) Codd. als der heutige offizielle Name anzusehen ist, soll in dieser Arbeit der gebräuchlichere Name *C. blumei* verwendet werden.



Abb. 1: *Coleus blumei* aus *Flore des serres et des jardins de l'Europe* by Charles Lemaire et al. Gent, Louis van Houtte, 1853, volume 8 (plate 801).

2 Rosmarinsäure

Rosmarinsäure (RS) ist ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (Abb. 2). 1958 wurde der sekundäre Pflanzenmetabolit erstmals von Scarpati und Oriente aus *Rosmarinus officinalis* isoliert, was auch zu seiner Namensgebung führte.

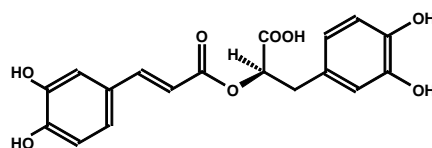


Abb. 2: Struktur der Rosmarinsäure.

Im Pflanzenreich ist Rosmarinsäure weit verbreitet. In der Familie der Boraginaceae ist sie durchwegs zu finden, wohingegen sie bei den Lamiaceae auf die Unterfamilie der Nepetoideae beschränkt ist (Litvinenko et al., 1975). Weiterhin kommt Rosmarinsäure bei Vertretern anderer Familien vor, wie z.B. bei Farnen der Familie der Blechnaceae (Häusler et al., 1992) oder bei Seegräsern der Zosteraceae (Petersen und Simmonds, 2003). Tabelle 1 soll einen kurzen Überblick über das Vorkommen geben. Die angegebene Tabelle wurde 2003 erstellt und müsste nach heutigen Erkenntnissen um weitere Pflanzenfamilien ergänzt werden. So isolierten z.B. Ly et al. (2006) Rosmarinsäure aus *Celastrus hindsii* Benth (Celastraceae).

Familie	Referenz
<i>Dicotyledonae</i>	
Apiaceae	Hiller, 1965
Araliaceae	Trute und Nahrstedt, 1996
Boraginaceae	Kelley et al., 1975
Cucurbitaceae	De Tommasi et al., 1991
Hydrophyllaceae	Petersen und Simmonds, 2003
Lamiaceae	Scarpati und Oriente, 1958; Litvinenko et al., 1975
Plantaginaceae	Kurkin et al., 1988, zitiert in Holzmanna, 1995
Rubiaceae	Aquino et al., 1990
Sterculiaceae	Satake et al., 1999
Tiliaceae	Lasure et al., 1994
<i>Monocotyledonae</i>	
Cannaceae	Yun et al., 2004
Zosteraceae	Ravn et al., 1994
Potamogetonaceae	Petersen und Simmonds, 2003
<i>Pteridopsida</i>	
Blechnaceae	Häusler et al., 1992
<i>Anthocerotopsida</i>	
Anthocerotaceae	Takeda et al., 1990

Tabelle 1: Vorkommen von Rosmarinsäure im Pflanzenreich (nach Petersen und Simmonds, 2003).

Es wird angenommen, dass RS der Pflanze als Schutz vor Pathogenen und Fraßfeinden dient. Der Pflanzenmetabolit besitzt vor allem adstringierende, antioxidative, entzündungshemmende, antibakterielle und antivirale Aktivität (Parnham und Kesselring, 1985). Er hemmt Lipoxxygenasen und Cyclooxygenasen und greift in die Komplement-Kaskade ein (Parnham und Kesselring, 1985), worauf seine entzündungshemmende Wirkung beruht.

Trotz vielversprechender Wirkungen wird isolierte Rosmarinsäure bislang nicht arzneilich genutzt. Ein Grund hierfür könnten die recht hohen Herstellungskosten sein. Das einzige auf Rosmarinsäure basierende Arzneimittel auf dem deutschen Markt ist eine Creme gegen Lippenherpes, die einen Melisse-Extrakt enthält (Lomaherpan®). Zusätzlich zur pharmazeutischen Anwendung stellt Rosmarinsäure für die Kosmetik-Industrie eine interessante Substanz dar.

2.1 Biosynthese der Rosmarinsäure

Die Biosynthese der Rosmarinsäure wurde mit Hilfe von Zellkulturen von *Coleus blumei* und *Anchusa officinalis* vollständig aufgeklärt (De-Eknamkul und Ellis, 1987; Petersen et al., 1993). Insgesamt sind 8 Enzyme des Sekundärstoffwechsels beteiligt, die bereits charakterisiert wurden (Petersen et al., 1993).

Als Ausgangsstoffe dienen die beiden Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin (Ellis und Towers, 1970). L-Phenylalanin wird zunächst durch die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5) zu trans-Zimtsäure desaminiert. Die PAL wurde 1977 von Razzaque und Ellis in *Anchusa officinalis* nachgewiesen und in Zellkulturen von *Coleus blumei* charakterisiert (Petersen, 1994). Die nachfolgende Hydroxylierung der Zimtsäure in Position 4 wird durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (CAH, E.C. 1.14.13.11), eine Cytochrom P450 Monooxygenase, katalysiert, die ebenfalls aus *C. blumei* Zellkulturen charakterisiert wurde (Petersen, 1997). Anschließend erfolgt die Aktivierung durch die Hydroxyzimtsäure: Coenzym A Ligase (4CL, E.C. 6.2.1.12) zu 4-Cumaroyl-CoA (Karwatzki et al., 1989; Petersen, 1997).

Als zweite Ausgangsaminosäure wird L-Tyrosin durch die Tyrosin-Aminotransferase (TAT, E.C. 2.6.1.5) zu 4-Hydroxyphenylpyruvat transaminiert (De Eknamkul und Ellis, 1987; Mizukami und Ellis, 1991; Kempin, 1994). Das gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat wird anschließend von der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR, E.C. 1.1.1.237) zum entsprechenden R(+)-4-Hydroxyphenyllaktat reduziert (Petersen und Alfermann, 1988; Häusler et al., 1991; Kim et al., 2004). 4-Hydroxyphenylpyruvat dient auch als Vorstufe für die Biosynthese von Tocopherolen und Plastochinonen (Moran, 2005).

Die so gebildeten Intermediate 4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllaktat werden unter Abspaltung von Coenzym A zu 4-Cumaroyl-4'-hydroxyphenyllaktat verestert (Petersen und Alfermann, 1988; Petersen, 1991; Petersen et al., 1993; Berger, 2001). Diese Reaktion wird durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllaktat Hydroxycinnamoyl Transferase (Syn. Rosmarinsäure Synthase) katalysiert (RAS, E.C. 2.3.1.140). Eine Volllänge cDNA dieses Enzyms wurde kürzlich aus *Coleus blumei* isoliert und in *E. coli* exprimiert (Berger et al., 2006).

Abschließend wird der Ester durch zwei Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen in 3- und 3'-Position zur Rosmarinsäure hydroxyliert (Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3- bzw. 3'-Hydroxylase). Eine 3'-Hydroxylase wurde vor kurzem ebenfalls von einer japanischen Arbeitsgruppe aus *Lithospermum erythrorhizon* Suspensionskulturen isoliert (Tsuruga et al., 2006).

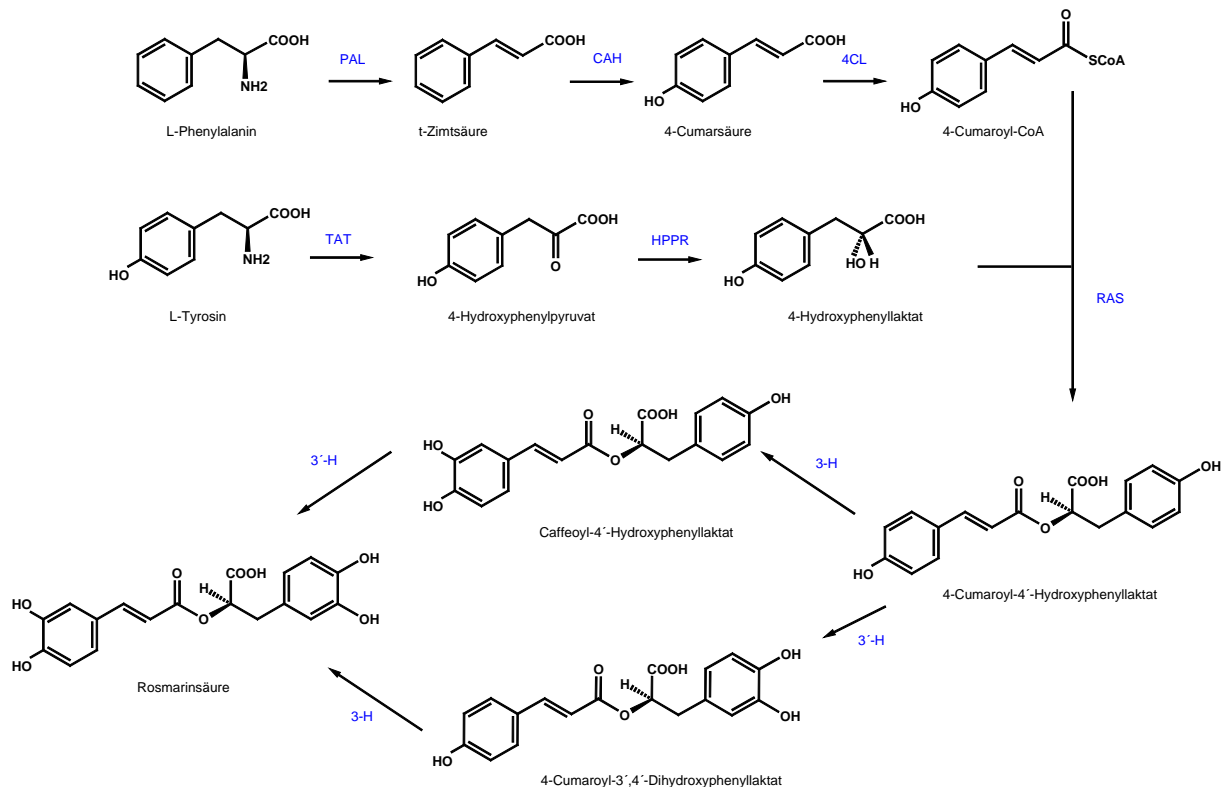


Abb. 3: Biosynthese der Rosmarinsäure.

PAL: Phenylalanin Ammoniak-Lyase; **CAH**: Zimtsäure 4-Hydroxylase; **4CL**: Hydroxyzimtsäure:Coenzym A Ligase; **TAT**: Tyrosin-Aminotransferase; **HPPR**: Hydroxyphenylpyruvat Reduktase; **RAS**: Rosmarinsäure Synthase; **3'-H**: Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3'-Hydroxylase; **3-H**: Hydroxycinnamoyl-Hydroxyphenyllaktat 3'-Hydroxylase

2.2 Hydroxyphenylpyruvat Reduktase

Die Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR, E.C. 1.1.1.237) katalysiert, wie oben beschrieben, die Reduktion von 4-Hydroxyphenylpyruvat zum entsprechenden 4-Hydroxyphenyllaktat (Petersen und Alfermann, 1988; Petersen et al., 1993). Da die Enzyme für die Umwandlung von Phenylalanin zu 4-Cumaroyl-CoA aus dem allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechsel stammen und das von der TAT gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat auch als Ausgangsstoff für die Tocopherol- und Plastochinon-Synthese dient, könnte die HPPR als das erste spezifische Enzym in der Rosmarinsäure-Biosynthese angesehen werden. In *C. blumei* Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die HPPR-Aktivität mit der Rosmarinsäurebildung korreliert (Szabo et al., 1999), was ebenfalls für ein spezifisches Enzym spricht.

Die HPPR wurde 1991 von Häusler et al. aus Zellkulturen von *C. blumei* vollständig charakterisiert. Das Enzym akzeptiert sowohl 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) als auch 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP), wobei der K_m -Wert für pHPP deutlich niedriger liegt.

Diese Tatsache und dass DHPP in vivo nicht nachgewiesen werden konnte, führte zu der Annahme, dass pHPP als das natürliche Substrat anzusehen ist. Phenylpyruvat wurde von der nativen HPPR nicht zum entsprechenden Laktat umgesetzt. Als Cosubstrat wird NADPH und - mit geringerer Affinität - auch NADH akzeptiert.

Das von der HPPR gebildete 4-Hydroxyphenyllaktat wurde als das R(+)-Stereoisomer nachgewiesen (Petersen, unveröffentlicht). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die RAS, die in der Rosmarinsäure-Biosynthese die Nachfolgereaktion katalysiert, nur das R(+)-4-Hydroxyphenyllaktat akzeptiert (Petersen, 1993).

K. H. Kim isolierte aus *C. blumei* Zellkulturen einen cDNA-Volllängenklon, der für ein Protein mit HPPR-Aktivität kodiert. Das Protein besteht aus 313 Aminosäuren und gehört nach Sequenzvergleichen in die Familie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (EMBL Datenbank AJ507733) (Kim et al. 2004). Abb. 4 gibt die DNA-Sequenz mit den entsprechenden Aminosäuren wieder.

M	E	A	I	G	V	L	M	M	C	P	M	S	T	Y	L	E	Q	18
ATG	GAG	GCG	ATT	GGC	GTT	TTG	ATG	ATG	TGC	CCG	ATG	AGC	ACC	TAC	TTG	GAG	CAA	54
E	L	D	K	R	F	K	L	F	R	Y	W	T	Q	P	A	Q	R	36
GAG	CTT	GAC	AAG	CGG	TTC	AAG	CTC	TTT	CGT	TAC	TGG	ACT	CAG	CCG	GCG	CAG	CGC	108
D	F	L	A	L	Q	A	E	S	I	R	A	V	V	G	N	S	N	54
GAC	TTC	CTC	GCT	CTG	CAG	GCC	GAG	TCT	ATC	CGC	GCG	GTG	GTT	GGG	AAT	TCG	AAC	162
A	G	A	D	A	E	L	I	D	A	L	P	K	L	E	I	V	S	72
GCC	GGT	GCC	GAT	GCT	GAG	TTG	ATC	GAC	GCA	CTG	CCG	AAA	CTG	GAG	ATT	GTG	TCG	216
S	F	S	V	G	L	D	K	V	D	L	I	K	C	E	E	K	G	90
AGC	TTT	AGC	GTG	GGT	CTG	GAT	AAG	GTT	GAC	TTG	ATC	AAG	TGT	GAG	GAG	AAG	GGG	270
V	R	V	T	N	T	P	D	V	L	T	D	D	V	A	D	L	A	108
GTT	AGG	GTT	ACC	AAC	ACG	CCC	GAT	GTG	CTG	ACG	GAT	GAC	GTC	GCG	GAT	TTG	GCG	324
I	G	L	I	L	A	V	L	R	R	I	C	E	C	D	K	Y	V	126
ATC	GGG	TTG	ATT	TTG	GCG	GTT	TTG	AGG	CGG	ATT	TGT	GAG	TGT	GAT	AAG	TAT	GTG	378
R	R	G	A	W	K	F	G	D	F	K	L	T	T	K	F	S	G	144
AGG	AGA	GGG	GCG	TGG	AAA	TTT	GGA	GAC	TTC	AAG	TTG	ACG	ACT	AAG	TTC	AGC	GGT	432
K	R	V	G	I	I	G	L	G	R	I	G	L	A	V	A	E	R	162
AAA	AGA	GTT	GGC	ATC	ATA	GGA	TTG	GGC	AGA	ATC	GGG	TTA	GCA	GTT	GCT	GAG	CGA	486
A	E	A	F	D	C	P	I	S	Y	F	S	R	S	K	K	P	N	180
GCA	GAG	GCA	TTT	GAT	TGT	CCA	ATC	AGT	TAC	TTT	TCA	AGA	TCC	AAG	AAA	CCC	AAC	540
T	N	Y	T	Y	Y	G	S	V	V	E	L	A	S	N	S	D	I	198
ACA	AAC	TAC	ACA	TAC	TAT	GGC	AGC	GTT	GTA	GAA	TTG	GCG	TCA	AAC	AGT	GAC	ATC	594
L	V	V	A	C	P	L	T	P	E	T	T	H	I	I	N	R	E	216
CTA	GTC	GTA	GCA	TGT	CCC	CTG	ACT	CCA	GAA	ACA	ACT	CAT	ATT	ATC	AAT	CGA	GAA	648
V	I	D	A	L	G	P	K	G	V	L	I	N	I	G	R	G	P	234
GTA	ATC	GAT	GCT	CTG	GGT	CCA	AAG	GGA	GTT	CTC	ATC	AAC	ATT	GGA	AGG	GGA	CCT	702
H	V	D	E	P	E	L	V	S	A	L	V	E	G	R	L	G	G	252
CAT	GTT	GAT	GAG	CCC	GAA	CTG	GTG	TCT	GCT	CTT	GTG	GAG	GGC	CGT	CTG	GGT	GGC	756
A	G	L	D	V	F	E	R	E	P	E	V	P	E	K	L	F	G	270
GCT	GGT	CTT	GAT	GTA	TTC	GAA	AGG	GAA	CCA	GAG	GTA	CCG	GAG	AAG	CTC	TTC	GGT	810

L	E	N	V	V	L	L	P	H	V	G	S	G	T	V	E	T	R	288
CTG	GAA	AAT	GTT	GTC	CTG	TTG	CCA	CAT	GTA	GGG	AGT	GGC	ACC	GTG	GAA	ACG	CGT	864
K	V	M	A	D	L	V	V	G	N	L	E	A	H	F	S	G	K	306
AAA	GTG	ATG	GCT	GAT	CTT	GTC	GTC	GGA	AAC	TTG	GAA	GCT	CAC	TTC	TCC	GGC	AAG	918
P	L	L	T	P	V	V	*	*										315
CCT	CTC	TTA	ACT	CCA	GTA	GTT	TGA	TAG										945

Abb. 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der putativen H(P)PR. In rot sind die konservierten AS der Enzymfamilie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen angegeben.

3 D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen

Die Enzymfamilie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen wurde 1989 von G. A. Grant als eigenständige Enzymfamilie definiert und zeichnet sich dadurch aus, nur Substrate zu akzeptieren, die D-Isomere sind und eine am C₂ befindliche Hydroxygruppe mit benachbarter Säurefunktion aufweisen. Diese C₂-Hydroxygruppe wird zu einer Oxogruppe oxidiert, wobei NAD⁺/NADP⁺ reduziert wird (Abb. 5).

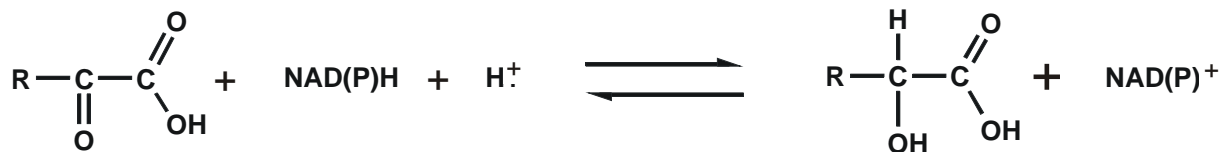


Abb. 5: Allgemeine Reaktion der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen.

Vertreter dieser Enzymgruppe sind Dimere oder seltener auch Tetramere und besitzen hoch konservierte Aminosäuren (vgl. Abb. 4) (Kochhar et al., 1992; Kim et al., 2004). Das Monomer ist meist in zwei Domänen unterteilt, wobei eine als die Substrat-Bindedomäne (oder katalytische Domäne) und die andere als die Cosubstrat-Bindedomäne (oder Nukleotid-Bindedomäne) bezeichnet wird. Zwischen beiden Domänen liegt das aktive Zentrum, das auch als katalytische Spalte (*catalytic cleft*) beschrieben ist (Abb. 6). Nach Bindung von Cosubstrat (und Substrat) bewegen sich die beiden Domänen aufeinander zu und verengen damit das aktive Zentrum zur Katalyse (Lamzin et al., 1994; Booth et al., 2006). Die genauen Abläufe werden noch diskutiert.

Bei wenigen Enzymen dieser Familie kommt zusätzlich eine dritte Domäne vor, die der Regulierung der Aktivität dient (vgl. D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase).

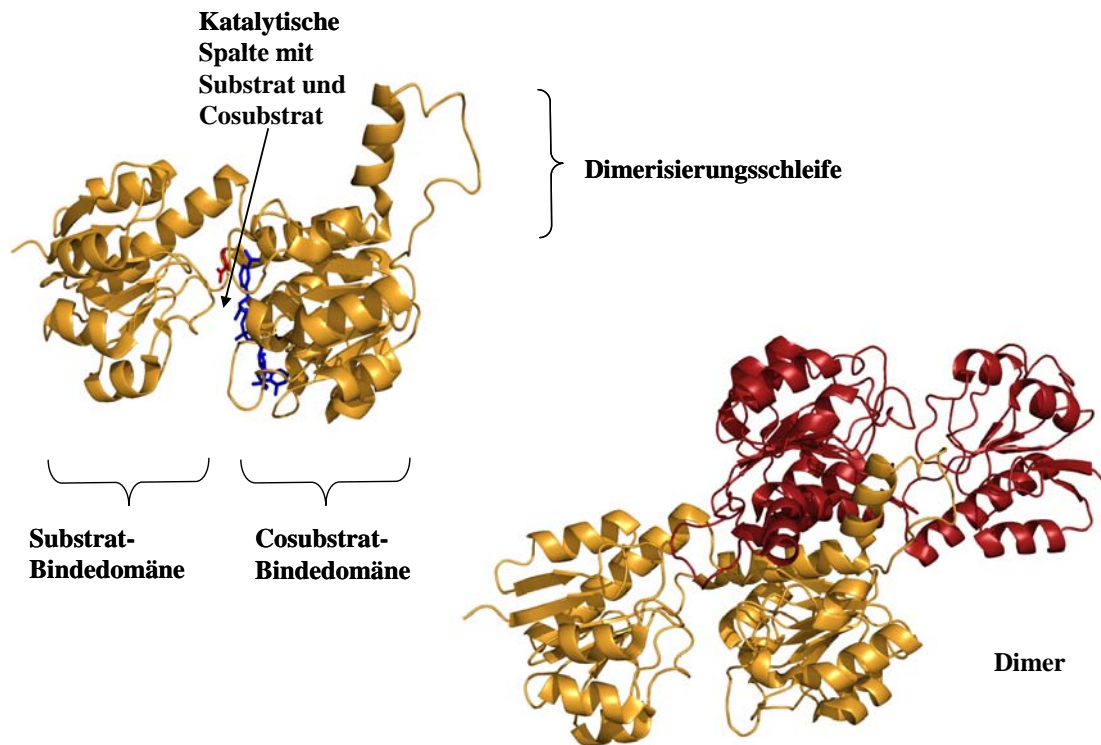


Abb. 6: Allgemeiner Aufbau der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen anhand der humanen Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase; PDB code: 2gcg (links oben Monomer, rechts das Dimer).

Einen Überblick über die bisher bekannten Protein-Sequenzen dieser Enzymfamilie gibt die InterPro Datenbank, die mit der Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt KB) verbunden ist. Mit diesem Suchsystem ist es möglich, nach Enzymfamilien, charakteristischen Domänen oder funktionellen Einheiten zu suchen (Mulder et al., 2003). Die NAD- wie auch die Substrat-Bindedomäne der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen sind als charakteristische Einheiten für diese Enzymfamilie angegeben. Dabei sind beide Domänen über Pfam Motive beschrieben (pfam PF02826 für die Cosubstrat- bzw. pfam PF00389 für die Substrat-Bindedomäne). Die Pfam Datenbank benutzt statistische Modelle von Sequenzvergleichen zur Erstellung von Proteinprofilen.

Die NAD-Bindedomäne ist zusätzlich über drei PROSITE Motive (PS00065, PS00670, PS00671) definiert. PROSITE erstellt aus konservierten Aminosäure-Regionen verwandter Proteine kurze Sequenzmotive, die zur Proteineinteilung genutzt werden können.

Bei einer Suche in der InterPro Datenbank nach der Substrat-Bindedomäne (IPR006139) ergaben sich 3080 Einträge. Bei der Cosubstrat-Bindedomäne (IPR006140) wurden 3800 Proteine angegeben. Einen Überblick über die gefundenen Sequenzen der Substrat-Bindedomäne soll Abbildung 7 geben (Stand September 2007).

In der Protein Daten Bank (PDB) sind mehrere Strukturen von D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen deponiert, davon keine aus Pflanzen.

Im Folgenden soll näher auf einzelne, für diese Arbeit wichtige Vertreter dieser Enzymfamilie eingegangen werden.

3.1 D-Laktat Dehydrogenasen

Laktat ist ein wichtiges Endprodukt der bakteriellen Fermentation von Glucose oder anderen Kohlenhydraten. Die milchsäurebildenden Bakterien umfassen vor allem Bakterien der Genera *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* und *Lactobacillus* (Garvie, 1980). Diese Bakterien wandeln das bei der Glykolyse anfallende Pyruvat in Laktat um und regenerieren damit NAD^+ aus NADH.

Diese Gruppe der NAD/NADH abhängigen Laktat Dehydrogenasen bezeichnet man auch als nLDHs. Je nachdem ob das gebildete Laktat das D(-) oder L(+) Stereoisomer ist, werden die Enzyme weiter in D(-)-nLDHs bzw. in L(+)-nLDHs eingeteilt.

Daneben gibt es auch Laktat Dehydrogenasen die ein anderes Cosubstrat verwenden. Diese Enzyme werden auch als NAD-unabhängige Laktat Dehydrogenasen (iLDHs) zusammengefasst (Garvie, 1980). Sie enthalten meist Flavin und wandeln hauptsächlich Laktat in Pyruvat um. Für die Rückreaktion gibt es keine Hinweise. In Katalase-positiven Organismen dient die Umwandlung von Laktat der Kohlenstoffnutzung. Von manchen iLDHs ist bekannt, dass sie am Elektronentransport beteiligt sind. In vielen Fällen jedoch ist die Funktion unbekannt. Auch bei dieser Gruppe von Laktat Dehydrogenasen wird je nach dem akzeptierten Laktat-Stereoisomer in D(-) und L(+) iLDHs unterteilt.

In Säugetieren kommen laktatspezifische D(-)-nLDHs oder iLDHs nicht vor (Gravie, 1980). L(+)-nLDHs sind dagegen weit verbreitet und spielen z.B. in der Humandiagnostik bei Gewebeschädigungen eine wichtige Rolle.

Bei Pflanzen kommen nur L-Laktat Dehydrogenasen vor (Taguchi und Ohta, 1991).

Von der bakteriellen D-LDH findet man vier Kristallstrukturen in der PDB, eine davon gehört zu der Gruppe der iLDHs (PDB code: 1fox; Dym et al., 2000). Razeto et al. publizierten 2002 zwei Strukturen der D-LDH aus *Lactobacillus bulgaricus* (PDB codes: 1j49, 1j4a). Die Struktur 1j49 hat NAD^+ gebunden. Die Monomere zeigen deutliche Unterschiede im Öffnungswinkel zwischen den beiden Domänen. Eine weitere D-LDH aus *Lactobacillus helveticus* wurde bereits 1995 von Bernard et al. in der PDB deponiert (PDB code: 2dld). Das Enzym ist mit NADH und Oxamat komplexiert.

3.2 Hydroxypyruvat Reduktasen (D-Glycerat Dehydrogenasen)

Das Enzym Hydroxypyruvat Reduktase (HPR) katalysiert die Reduktion von Hydroxypyruvat zu D-Glycerat und wurde aus Säugetieren, Pflanzen und Bakterien isoliert. Neben Hydroxypyruvat wird meist Glyoxylat mit geringerer Aktivität umgesetzt.

In der Literatur wird dieses Enzym sowohl Hydroxypyruvat Reduktase als auch D-Glycerat Dehydrogenase genannt, was zu einigen Verwirrungen führt. In den Enzymdatenbanken finden sich sogar zwei Klasseneinträge (EC 1.1.1.29 (GDH) und EC 1.1.1.81 (HPR)). Eine eindeutige Bezeichnung wäre D-Glycerat:NAD(P) Oxidoreduktase.

In Pflanzen ist die HPR weit verbreitet. Vor allem in Blättern höherer Pflanzen ist eine hohe Enzymaktivität anzutreffen (Stafford, 1954). Obwohl die HPR aus vielen unterschiedlichen Pflanzen gereinigt und charakterisiert wurde, sind bislang nur wenige pflanzliche Nukleotidsequenzen und keine Kristallstruktur bekannt.

Lange wurde angenommen, dass die HPR ausschließlich in Peroxisomen vorkommt und dort an der Photorespiration bzw. Serin-Biosynthese beteiligt ist (Abb. 8). Die Photorespiration dient der Kohlenstoff-Rückgewinnung. Dies ist nötig, da Rubisco bei Anwesenheit von O₂ oxygeniert wird, was zur Bildung von 2-Phosphoglykolat führt. Dadurch wird der Photosynthese Kohlenstoff entzogen, was durch die Photorespiration als 3-Phosphoglycerat dem Calvin-Zyklus wieder zugeführt werden muss. Mutanten, die keine Photorespiration ausführen können, sind in normaler Atmosphäre nicht überlebensfähig (Somerville, 2001; Boldt et al., 2005).

Die Photorespiration läuft in drei Zellorganellen, den Chloroplasten, den Peroxisomen und den Mitochondrien ab. Dabei wird Sauerstoff genutzt, um zunächst Glykolat zu gewinnen, das in den Peroxisomen weiter zu Glycin umgewandelt wird. Glycin wird in die Mitochondrien transportiert, dort zu Serin kondensiert, das wiederum zurück in die Peroxisomen geschleust wird. In den Peroxisomen wird Serin zum Hydroxypyruvat transaminiert. Die Hydroxypyruvat Reduktase katalysiert anschließend die Reduktion des Hydroxypyruvats zu Glycerat, welches in die Chloroplasten wandert und dort nach Phosphorylierung dem Calvin-Zyklus zugeführt wird.

Dieses peroxisomale Enzym (HPR-1) wurde aus verschiedenen Pflanzen charakterisiert (z.B. Stafford, 1954; Zeltich, 1955; Sallach 1966; Titus et al., 1983; Anderson und Emes, 1985; Greenler et al., 1989). Es liegt in vivo als Dimer vor und bevorzugt NADH vor NADPH als Cofaktor.

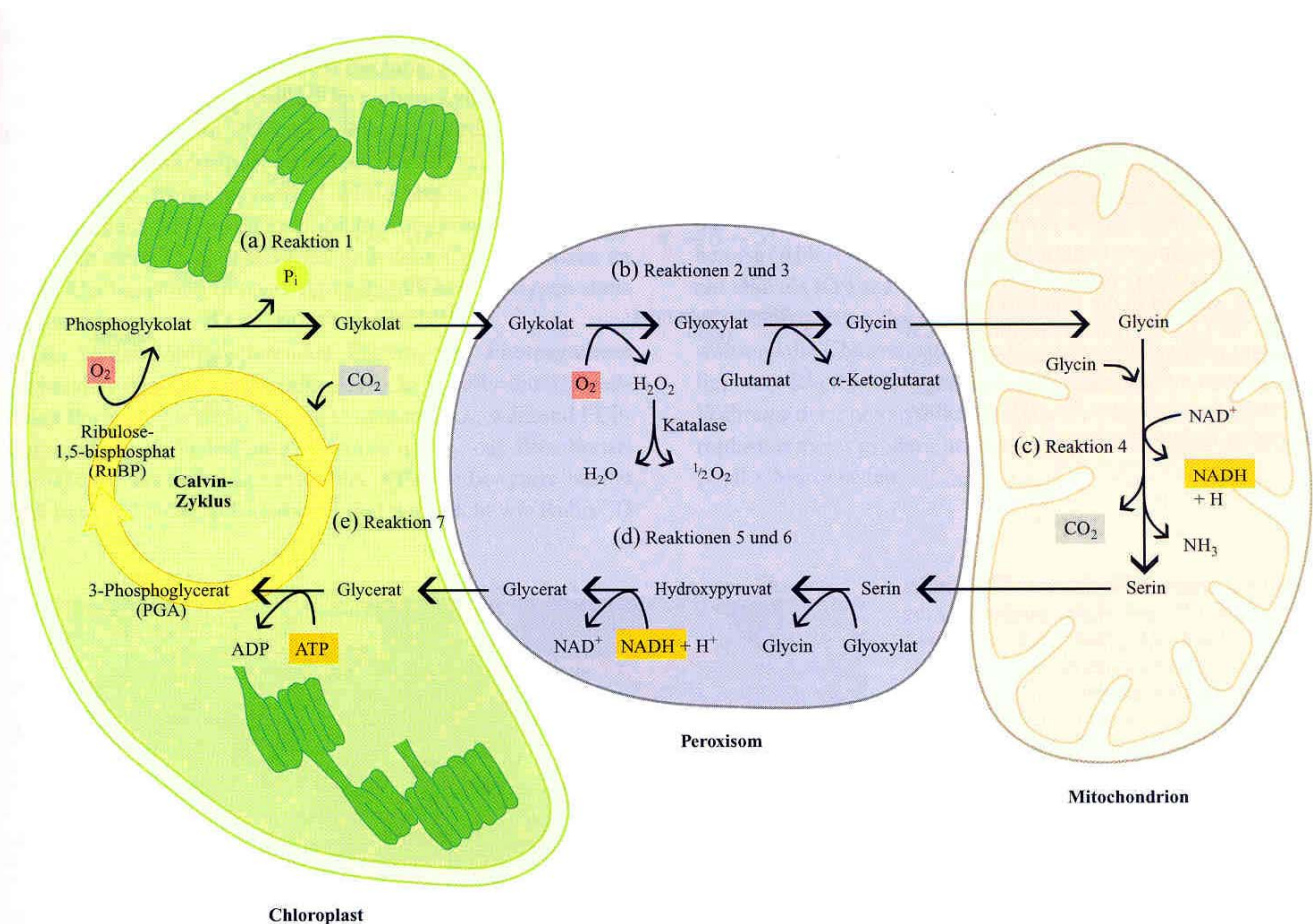


Abb. 8: Oxidativer Kohlenstoffzyklus der Photorespiration in Blattperoxisomen, aus *Biologie der Pflanzen*, Raven, Evert, Curtis (1988).

1988 isolierte Kleczkowski eine cytosolische HPR aus Blättern von Spinat und Erbse, die NADPH als reduzierenden Cofaktor bevorzugte. Dieses Enzym konnte ebenfalls geringfügig in Chloroplasten nachgewiesen werden. Das als HPR-2 bezeichnete Enzym setzt wie die HPR-1 Hydroxypyruvat und mit niedrigerer Aktivität auch Glyoxylat um und liegt als Dimer vor. Es wird durch Oxalat selektiv gehemmt (Kleczkowski et al., 1991).

Obwohl eine eindeutige Funktion der HPR-2 nicht nachgewiesen werden konnte, so wurde angenommen, dass das Enzym für die Umsetzung von aus Peroxisomen ausgetretenem Hydroxypyruvat verantwortlich sei. Dies könnte an der Durchlässigkeit der Peroxisomenmembran oder an einem NADH-Mangel in den Peroxisomen liegen (Kleczkowski und Randall, 1988; Kleczkowski und Edwards, 1989). Eine englische Arbeitsgruppe (Murray et al., 1989) konnte anhand von HPR-1-Mangelmутanten der Gerste zeigen, dass die in Pflanzen gefundene Glyoxylat Reduktase (GR) Aktivität nicht mit der HPR-1 Aktivität korreliert, obwohl die HPR-1 auch Glyoxylat umsetzt. Dies lässt erkennen, dass ein unabhängiges GR-Enzym in Gerste existiert. Sie konnten ebenfalls demonstrieren, dass die NADPH-abhängige HPR Aktivität zum größten Teil (81%) von der HPR-1 ausgeht. Weiterhin wurde beobachtet,

dass auch ohne HPR-1 die Photorespiration in den Mutanten ablief. Dies würde die von Kleczkowski aufgestellte Hypothese, die die HPR-2 als Backup-Enzym der HPR-1 sieht, bestätigen.

Beide HPRs zeigen sowohl differierende Molekulargewichte als auch unterschiedliche immunologische Nachweisbarkeit (Kleczkowski und Randall, 1988). Bis heute sind aus Pflanzen 13 HPR-1 Sequenzen bekannt, davon 4 putative und 3 Fragmente. Für das HPR-2 Gen gibt es nach meiner Erkenntnis noch keine Sequenz.

Bei Bakterien kommt dem Enzym eine bedeutende Aufgabe im Tartratabbau zu (Kohn, 1968). In methylothrophen Bakterien spielt die HPR eine wichtige Rolle im Serin-Weg, bei dem Formaldehyd in Zwischenprodukte eingebaut wird, die wiederum für den allgemeinen Stoffwechsel wichtig sind. Auf diese Weise können die Bakterien Methan und Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Anthony, 1982; Goldberg et al., 1994).

Eine solche HPR/GDH aus dem methylothrophen Bakterium *Hyphomicrobium methylovorum* wurde von Goldberg et al. 1994 kristallisiert und stellt damit die bislang einzige Kristallstruktur einer bakteriellen HPR dar (PDB code: 1gdh).

Ausschließlich NADH wird von dem bakteriellen Enzym als Cosubstrat akzeptiert. Das Monomer besteht aus 322 AS mit einem Molekulargewicht von 38 kDa (Goldberg et al., 1994).

Vor Kurzem wurde eine menschliche Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase kristallisiert (GRHPR, PDB code: 2gcg) (Booth et al., 2006). Das Enzym ist vor allem im Cytosol der Leber zu finden, wo es zum einen Glyoxylat in Glykolat und zum anderen Hydroxypyruvat in D-Glycerat umwandelt. Für beide Reaktionen wird NADPH als Cofaktor bevorzugt.

Eine genetische Störung der GRHPR führt im Menschen zu einer Anreicherung an Glyoxylat, das von einer L-Laktat Dehydrogenase vermehrt zu Oxalat oxidiert wird. Dieses kann vor allem als schwer lösliches Calciumoxalat zu Nierensteinen und Nierenschädigungen führen. Das Enzym besteht aus 328 AS pro Untereinheit und wurde mit Substrat und Cosubstrat kristallisiert.

Sowohl das humane Enzym, als auch das bakterielle aus *H. methylovorum* liegt als Homo-Dimer vor und zeigt den für die Enzymfamilie typischen Aufbau.

3.3 D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenasen (3-Phosphohydroxypyruvat Reduktasen)

Das Enzym Phosphoglycerat Dehydrogenase (PGDH) kommt sowohl bei Säugetieren, bei Prokaryoten als auch bei Pflanzen vor. Es ist an der Biosynthese von Serin beteiligt.

In Pflanzen gibt es mehrere Biosynthesewege für Serin. Der Hauptteil an Serin wird unter Lichteinwirkung über die Photorespiration gebildet (vgl. Abbildung 6). Daneben gibt es noch den “phosphorylierten” und den “nicht-phosphorylierten” Weg ausgehend von 3-Phosphoglycerat (Ho et al., 1999). Diese beiden Wege sind vor allem für nicht-photosynthetische Gewebe oder im Dunkeln wichtig. Das 3-Phosphoglycerat wird aus dem Pentose-Phosphatweg oder aus der Glykolyse bereitgestellt.

Der “phosphorylierte” Biosyntheseweg dient auch bei Prokaryoten zur Serinproduktion (Pestka und Delwiche, 1981). Zunächst wird dabei durch die PGDH 3-Phosphoglycerat zu 3-Phosphohydroxypyruvat oxidiert. Dieses wird zu 3-Phosphoserin transaminiert und als letzter Schritt das Phosphat abgespalten (Abbildung 9).

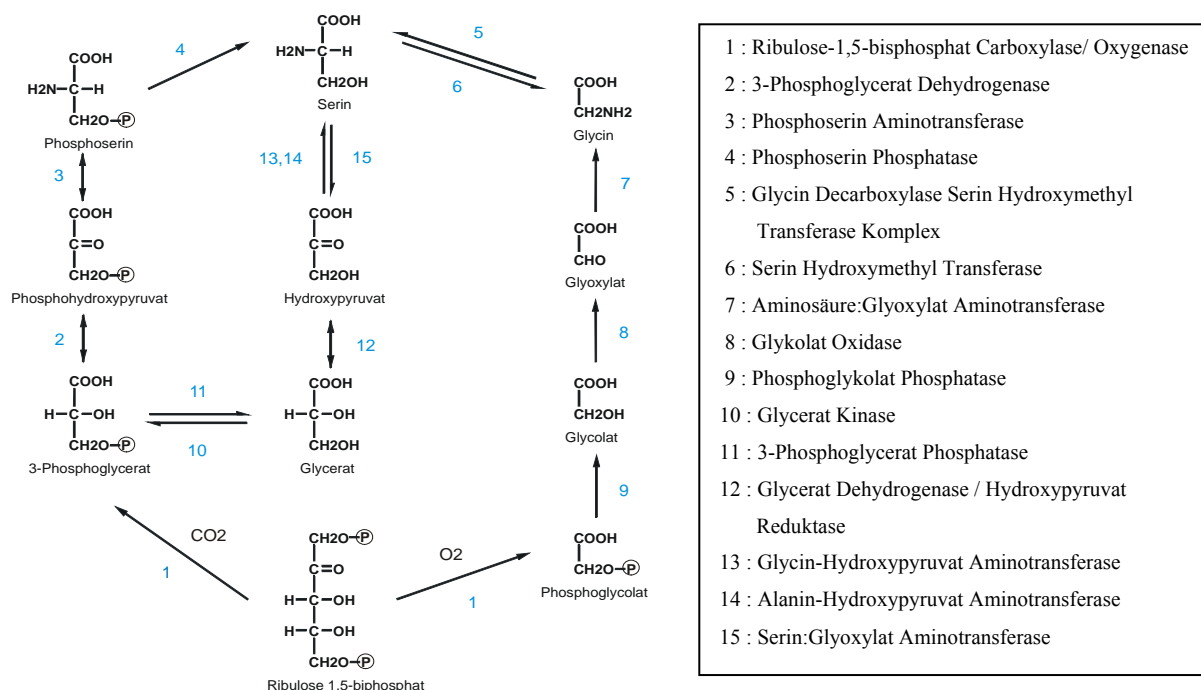


Abb. 9: Serin-Biosynthese in höheren Pflanzen.

Die PGDH aus *E. coli* liegt als Tetramer vor und bildet damit eine Ausnahme in der Familie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen. Die DNA-Sequenzen der pflanzlichen PGDHs weisen eine Signalsequenz auf, die zur Einschleusung des Proteins in Chloroplasten bzw. Plastiden dient (Ho et al., 1999).

Von den PGDHs aus Erbse und aus Bakterien wurde berichtet, dass diese durch Serin allosterisch/kooperativ gehemmt werden (Slaughter und Davis, 1968; Sugimoto und Pizer, 1968; Dubrow und Pizer, 1977). Diese Rückkopplung konnte nicht bei der PGDH aus Spinat oder den Enzymen aus Säugetieren beobachtet werden.

Schuller et al. präsentierten 1995 erstmals eine Kristallstruktur der Phosphoglycerat Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (PDB code: 1psd). Das Protein ist in drei Domänen aufgeteilt. Neben der Substrat- und Cosubstrat-Bindedomäne gibt es noch eine regulatorische oder auch Serin-Bindedomäne. Serin hemmt durch Bindung an diese dritte Domäne die Isomerisierung des ternären Protein-Komplexes und damit die katalytische Aktivität. Mittlerweile sind neun weitere Strukturen des Proteins in der PDB zu finden.

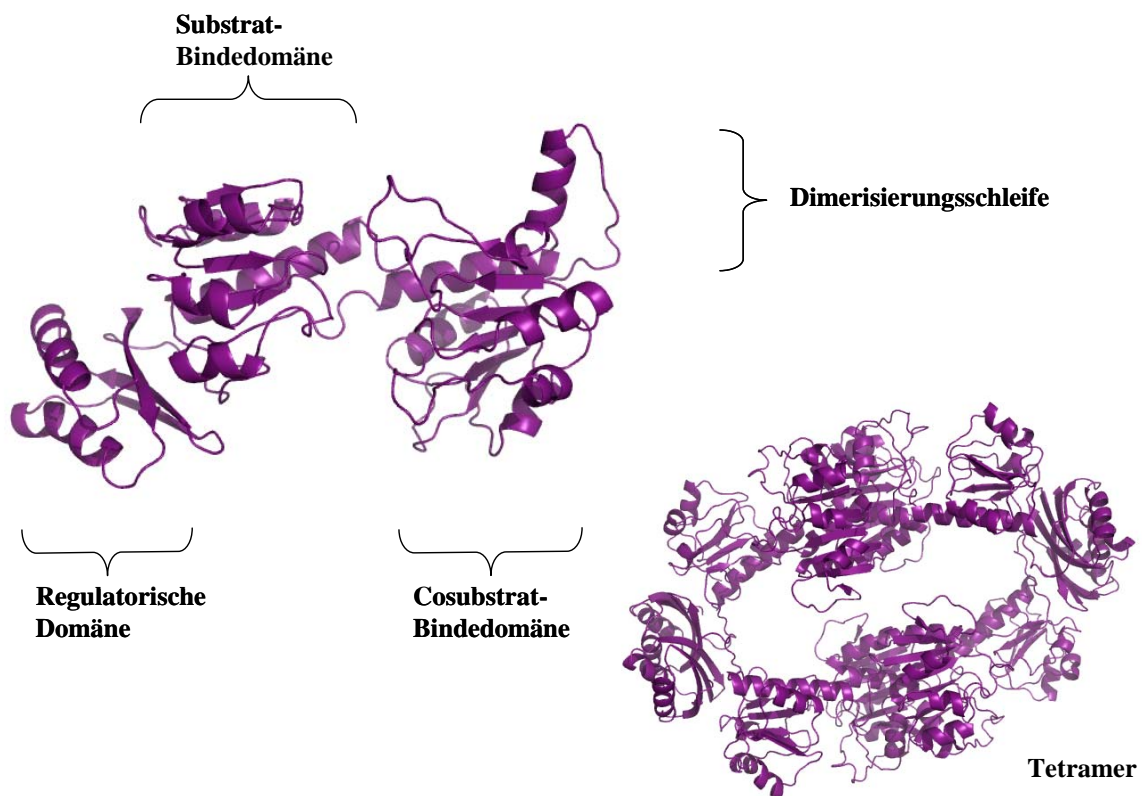


Abb. 10: Struktur der Phosphoglycerat Dehydrogenase aus *E. coli* (PDB code: 1psd).

3.4 D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenasen

Die 2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase (D-HicDH) ist bislang nur in Bakterien gefunden worden. Die Funktion *in vivo* ist nicht bekannt, obwohl man annimmt, dass das Enzym am Abbau von Aminosäuren beteiligt sein könnte (Kallwass, 1988). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass es keine Regulatoren dieses Enzyms gibt (Hummel et al, 1985) und dass ein breites Substratspektrum vorliegt. So reduziert die D-HicDH eine große Palette an 2-Oxocarbonsäuren mit verzweigten und unverzweigten aliphatischen, aromatischen und heteroaromatischen Seitenketten. Diese Eigenschaft macht das Enzym zu einem nützlichen Werkzeug bei der Synthese von chiralen Substanzen (Hummel und Kula, 1989).

Die D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus *L. casei* wurde von Dengler et al. (1997) kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 1,9 Å bestimmt. Das Enzym ist ein Homodimer bestehend aus zwei Untereinheiten mit jeweils 333 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 37 kDa. Das Enzym hat sowohl NAD als auch 2-Oxoisocaproat als Substrat gebunden (PDB code: 1dxy). Die Konformation wird als offen beschrieben.

3.5 Formiat Dehydrogenasen

Das Enzym Formiat Dehydrogenase (FDH) katalysiert die einfachste NAD-abhängige Dehydrogenierung einer Kohlenstoffsubstanz, nämlich die Oxidation des Formiat-Anions zu CO₂ mit gleichzeitiger Reduktion von NAD zu NADH (Popov, 1994). In methylotrophen Bakterien dient die Oxidation von Methanol über Formiat zu CO₂ der Energiegewinnung und zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADH). Formiat Dehydrogenasen sind auch in weiteren Mikroorganismen, Tieren und in höheren Pflanzen zu finden.

Neben NAD-abhängigen FDHs gibt es auch eine uneinheitliche Gruppe von Formiat Dehydrogenasen, die Metallionen und prosthetische Gruppen enthalten und sich durch ein hohes Molekulargewicht auszeichnen (Popov, 1994; Alves, 2003).

In Pflanzen kommt FDH vor allem in Mitochondrien vor, weshalb die Aminosäuresequenz auch eine Signalsequenz für den Import in Mitochondrien enthält. Das Enzym ist NADH-abhängig und katalysiert irreversibel die Oxidation von Formiat zu CO₂. Eine französische Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass hohe Aktivitäten der FDH vor allem in nicht-photosynthetischem Gewebe zu finden sind, wohingegen die Aktivität in Blättern eher gering ist (Colas des Francs-Small, 1993). Dies ist eine widersprüchliche Entdeckung, da doch

angenommen wurde, dass die FDH in Blättern dafür verantwortlich sei, das bei der Photorespiration anfallende Formiat abzubauen. Dies führte zu der Annahme, dass es in Mitochondrien von nicht-photosynthetischem Gewebe einen noch unbekannten anaeroben Metabolismus gibt, der große Mengen an Formiat produziert (Colas des Francs-Small, 1993). Durch Sequenzvergleiche wurde Formiat Dehydrogenase zu der Enzymfamilie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen gezählt (Vinalis et al., 1993), obwohl zum einen das Substrat kein Chiralitätszentrum besitzt, zum anderen das Hydridion von C₁ anstelle von C₂ abgespalten wird. Dennoch weist die Sequenz der FDH die meisten der für diese Familie konservierten Aminosäuren auf. Neben der ähnlichen AS-Sequenz zeigt die FDH auch die für diese Familie typische Proteinfaltung.

Von der FDH gibt es mehrere Proteinstrukturen. Eine davon ist aus *Pseudomonas sp.*, Stamm 101 (Lamzin et al., 1994). Das Protein ist ebenfalls ein Dimer mit zwei identischen Untereinheiten, die aus jeweils 393 Aminosäuren bestehen. Der generelle Aufbau gleicht dem der anderen Mitglieder dieser Enzymfamilie (PDB code: 2nac und 2nad). Die beiden Domänen in der 2nac Struktur liegen in einer offenen Konformation vor, die zweite Struktur dagegen hat NAD⁺ gebunden und zeigt eine geschlossene Konformation.

3.6 Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenasen

Die Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenase (PdxB) ist in einigen gram-negativen Bakterien (γ -Proteobakterien) an der Biosynthese von Pyridoxin, einem der sechs Vitamin B6 Vitamere, beteiligt (Yang et al., 1998; di Salvo et al., 2003). Vitamin B6 besitzt als Cofaktor eine wichtige Rolle bei Stoffwechselreaktionen (z.B. Aminosäurebiosynthese) und wurde als potentes Antioxidans beschrieben (Ehrenshaft et al., 1999). Heute geht man von zwei grundlegenden Vitamin B6 Biosynthesewegen aus, einem aus γ -Proteobakterien (DXP-abhängiger Syntheseweg) und einem, der in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vorkommt (DXP-unabhängiger Syntheseweg). Dabei sind Organismen immer nur zu einem von beiden Biosynthesewegen befähigt (Ehrenshaft et al., 1999).

PdxB kommt ausschließlich im DXP-abhängigen Weg vor, der sehr gut aus *Escherichia coli* untersucht ist (Hill et al., 1996; Laber et al., 1999). Der Syntheseweg ist in Abbildung 11 dargestellt.

Ausgehend von dem aus dem Calvin-Zyklus stammenden Erythrose-4-Phosphat wird durch Oxidation 4-Phosphoerythronat gebildet. Dieses wird durch die Erythronat-4-phosphat Dehydrogenase (PdxB) zum Keton oxidiert, das weiter zu 4-Phosphohydroxy-L-threonin transaminiert wird. Nach mehreren Reaktionsschritten entsteht schließlich durch Ringschluss mit 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) das Vitamin B6 Vitamer Pyridoxin-5'-phosphat. Dieses kann durch Phosphatabspaltung weiter zum Pyridoxin umgewandelt werden.

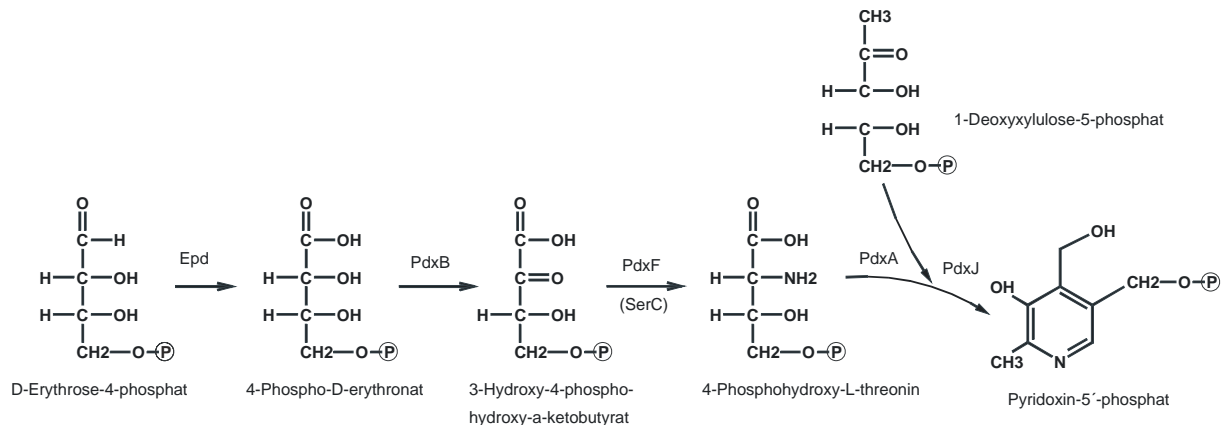


Abb. 11: Vitamin B6 Biosynthese in *E. coli* (DXP-abhängiger Biosyntheseweg).

Epd: Erythrose-4-phosphat Dehydrogenase; **PdxB**: Erythronat-4-phosphat Dehydrogenase; **PdxF (SerC)**: o-Phospho-4-hydroxy-L-threonin:2-Oxoglutarat Aminotransferase; **PdxA**: 4-Hydroxythreonin-4-phosphat Dehydrogenase; **PdxJ**: Pyridoxin-5'-phosphat Synthase

Neben Bakterien können auch Pilze und Pflanzen Vitamin B6 synthetisieren. Säugetiere sind dazu nicht in der Lage. Sie müssen Vitamin B6 über die Nahrung zuführen. Es wird allerdings angenommen, dass alle Organismen durch Enzyme des Salvage-Weges die einzelnen Vitamere (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin und deren 5'-Phosphorsäureester) ineinander umwandeln können (Genau, 2002).

Über den DXP-unabhängigen Biosyntheseweg ist noch recht wenig bekannt. Ehrenshaft et al. klonierten 1999 ein für die Pyridoxin-Synthese wichtiges Gen aus dem Pilz *Cercospora nicotianae* (Ehrenshaft et al., 1999). Graham et al. wiesen 2004 ein ähnliches pflanzliches Gen aus *Phaseolus vulgaris* nach. In dem grampositiven Bakterium *Bacillus subtilis* und in *Arabidopsis thaliana* konnte schließlich die Biosynthese aufgeklärt werden (Burns et al., 2005; Tambasco-Studart et al., 2005; Wagner et al., 2006). Diese ist, verglichen mit dem aus *E. coli* stammenden Weg, grundlegend verschieden (Abbildung 12).

Als Ausgangssubstanzen werden Ribose-5-phosphat (oder Ribulose-5-phosphat) und Glyceraldehyd-3-phosphat (oder Dihydroxyaceton-phosphat) postuliert. Zwei Enzyme, PDX1 und PDX2, transferieren die Aminogruppe von Glutamin unter Bildung von Pyridoxal-5'-phosphat.

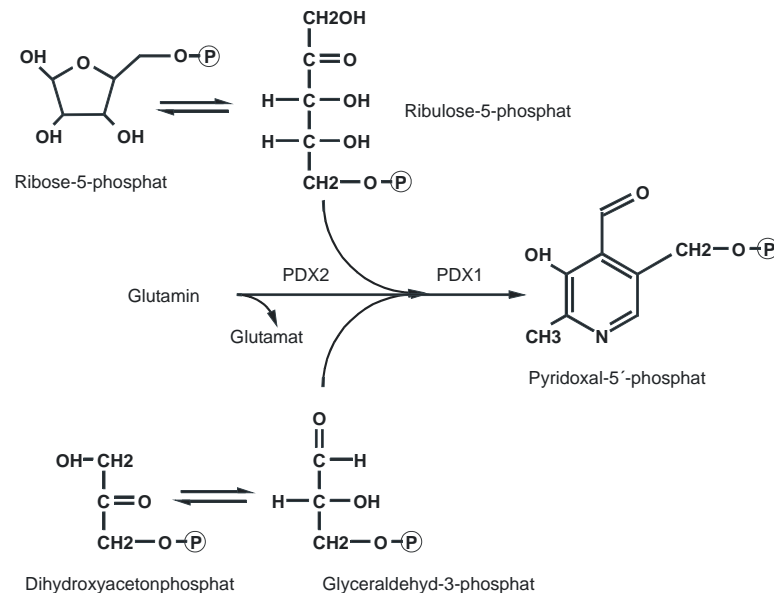


Abb. 12: DXP-unabhängige Vitamin B6 Biosynthese.

(**PDX1** bzw **2**: Pyridoxin Biosynthese Protein 1 bzw. 2)

Eine Struktur des PdxB Proteins aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde Anfang 2007 veröffentlicht (PDB code: 2o4c) (Ha et al., 2006 und 2007). Jede Untereinheit des Homodimers besteht aus 380 AS. Das Monomer ist in drei Domänen unterteilt, eine Substrat-Bindedomäne, die von den Autoren als Deckeldomäne (lid domain) bezeichnet wird, einer Cosubstrat-Bindedomäne und einer Dimerisierungsdomäne (siehe Abbildung 13). Die Dimerisierungsdomäne, die in keiner anderen Struktur der D-isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase Enzymfamilie vorkommt, besteht aus den letzten 89 Aminosäuren des C-Terminus. Beide Monomere in der Struktur zeigen unterschiedliche Konformationen und haben neben NAD Phosphat, bzw. L(+)-Tartrat gebunden.

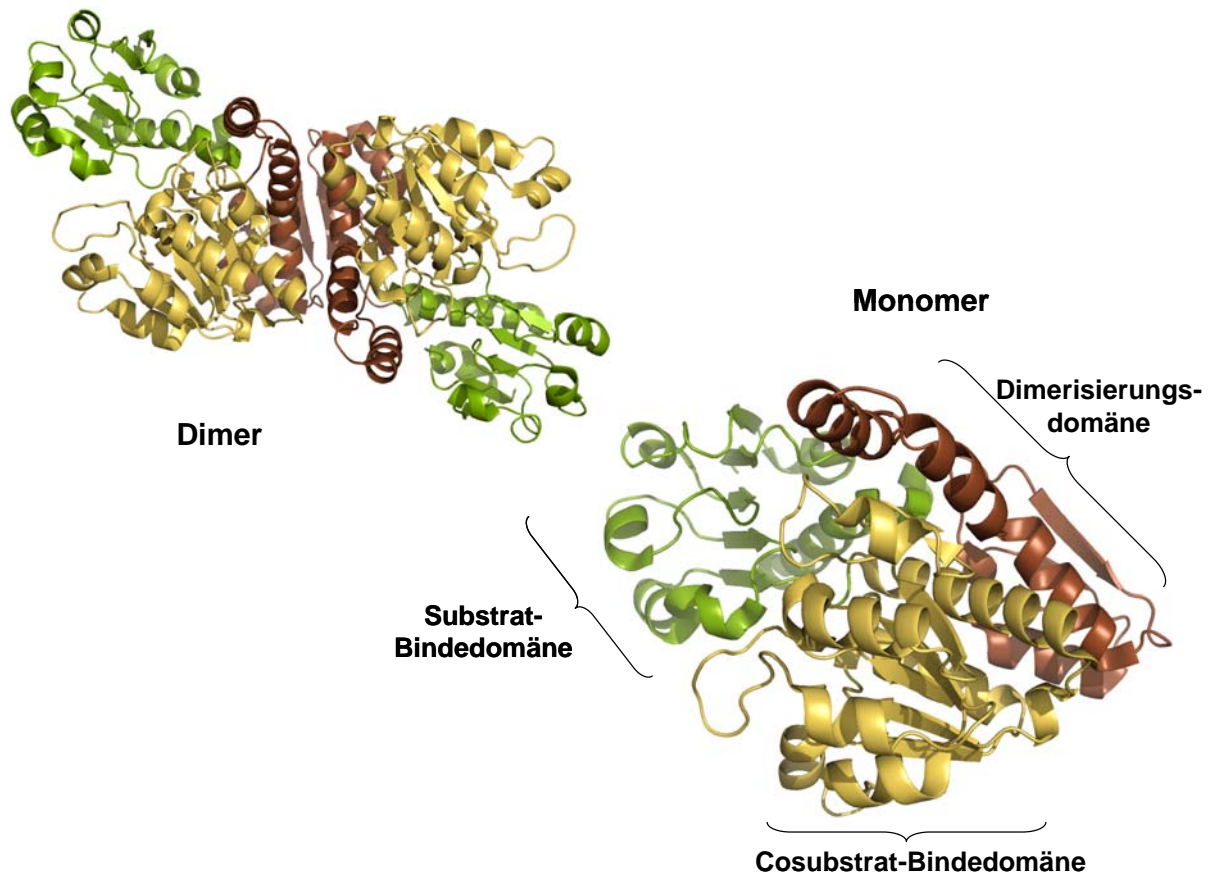


Abb. 13: Struktur der Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenase aus *P. aeruginosa* (PDB code: 2o4c). Darstellung: Substrat-Bindedomäne in grün, Cosubstrat-Bindedomäne in gelb und Dimerisierungsdomäne in braun. Links oben ist das Dimer und rechts unten das Monomer abgebildet.

4 Ziele dieser Arbeit

Das Anliegen dieser Arbeit war, die von K. H. Kim isolierte D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase aus *C. blumei* zu charakterisieren und ihre Funktion als Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) zu bestätigen.

Zusätzlich sollten ähnliche Enzyme aus anderen Pflanzen isoliert werden, um weitere Hinweise auf die evolutionäre Entwicklung der HPPR zu erlangen.

Durch Kristallisation und Bestimmung der Kristallstruktur sollten Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus und über die Funktion der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase gewonnen werden.

II Material und Methoden

5 Proteinchemische Methoden

5.1 SDS-Polyacrylamid Gel

Um die Reinheit von Proteinlösungen zu kontrollieren, wurden die Proben nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol und Erhitzen auf 100°C auf ein Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltiges Polyacrylamidgel nach Lämmli aufgetragen (Lämmli, 1970). Bei dieser Methode werden Proteine durch SDS denaturiert und verbinden sich mit diesem zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen, die durch ihr konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis im elektrischen Feld über eine poröse Polyacrylamidmatrix aufgetrennt werden können.

5.1.1 Herstellung von Trenn- und Sammelgel

Nach Vermischen der unten aufgeführten Trenngelkomponenten wurde die Lösung in eine Gelgießkammer gegeben und mit n-Butanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das n-Butanol ausgewaschen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm eingeführt.

Trenngel (12,2%):

4,1 ml	Rotiphorese [®] Gel 30 (Roth)	0,2 ml	SDS 20%
2,5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	70 µl	APS 10%
3,2 ml	dem. Wasser	16 µl	TEMED p.a.

Sammelgel (4,5%):

375 µl	Rotiphorese [®] Gel 30 (Roth)	50 µl	SDS 20%
625 µl	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	15 µl	APS 10%
1,45 ml	dem. Wasser	5 µl	TEMED p.a.

5.1.2 Probenvorbereitung

Die aufzutragende Proteinmenge konnte, falls die Lösung nicht konzentriert genug war, mit einer Trichloressigsäure-Fällung erhöht werden, andernfalls wurde die Proteinlösung direkt weiterverwendet.

Für die Fällung wurde die Proteinlösung mit einer Endkonzentration von 20% Trichloressigsäure versetzt, auf Eis für 1 Stunde inkubiert und bei 13000 UpM für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde mit kaltem 80%igem Aceton zweimal gewaschen, für 20 min. im Exsiccator getrocknet und in 0,1 M Natriumcarbonatlösung mit 10% Saccharose wieder aufgenommen.

Zum Reduzieren und Denaturieren der Proteine stand der Roti®-Load 1 Proteinauftragspuffer zur Verfügung. Dieser 4-fach konzentrierte Puffer wurde den Proben beigemischt, das Ganze für 5 min. gekocht und kurz abzentrifugiert.

Zur späteren Abschätzung der Proteingröße wurden 5-10 µl des Roti®-Mark STANDARD Protein-Molekulargewichtsmarkern ebenfalls aufgetragen.

Roti®-Mark STANDARD Protein-Molekulargewichtsmarker:

Protein	MW (kDa)		
		Ovalalbumin, Huhn	43
Myosin, Rind	200	Carboanhydrase	29
β-Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	119	Trypsininhibitor, Soja	20
Serumalbumin, Rind	66	Lysozym, Huhn	14,5

5.1.3 Gelelektrophoresebedingungen

Nach dem Einpipettieren der Proben in die Geltaschen wurde das Gel bei 180V so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel konnte danach entnommen und wie unter 5.1.4 beschrieben gefärbt werden.

Elektrophoresepuffer pH 8,8:

25 mM	Tris/HCl
0,192 M	L-Glycin
0,1 %	SDS

5.1.4 Coomassie Färbung

Für die Herstellung der Färbelösung wurde zunächst das Coomassie Brilliant Blue R-250 eingewogen, in Methanol gelöst und nach Zugabe der restlichen Bestandteile zweimal filtriert. Das Gel wurde mit der Färbelösung bedeckt und für 5-30 min. unter leichtem Wippen inkubiert. Danach wurde es mit Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel der Lösung soweit entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Die Entfärbelösung konnte unter Zugabe von Aktivkohle und anschließendem Filtrieren wieder regeneriert werden.

Coomassie Färbelösung:

825 mg	Coomassie Brilliant Blue R-250
150 ml	Methanol p.a.
150 ml	dem. Wasser
30 ml	Eisessig

Coomassie Entfärbelösung:

150 ml	Methanol p.a.
150 ml	dem. Wasser
30 ml	Eisessig

5.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung von Protein erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Hierzu wurden 10 µl der Proteinlösung mit 2 ml Bradfordlösung in einer Küvette gemischt und nach 15 min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur bei 595 nm photometrisch vermessen. Als Referenz diente BSA mit einer Konzentration von 1 mg/ml.

Zur Herstellung der Bradfordlösung wurde Coomassie Brilliant Blue G-250 abgewogen, in Ethanol gelöst und nach Zumischen der anderen unten angegebenen Bestandteile zweimal filtriert.

Bradford-Lösung:

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G-250
50 ml	Ethanol p.a.
850 ml	dem. Wasser
100 ml	o-Phosphorsäure 85%

6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

6.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt (Giuliano et al., 1993). Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 13030 UpM. Auf Eis wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen 500 µl Extraktionspuffer (4,23 M Guanidinthiocyanat, 7 mM Natrium-sarcosinat, 225 mM Natriumacetat pH 5,2) mit 400 µl Citratpuffer-gesättigtem Phenol (0,1 M, pH 4,3) und 3,5 µl 2-Mercaptoethanol vorgelegt.

Die Pflanzenmaterialien (etwa 200 mg) wurden in flüssigem Stickstoff möglichst fein zermörsernt und schnell in die Reaktionsgefäße mit der Extraktionslösung überführt. Nach kurzem Mischen wurde 100 µl Chloroform zugesetzt, alles gut gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Beim Mörsern sollte man darauf achten, dass immer genügend flüssiger Stickstoff vorhanden ist, der die Zellen kühlt, da ansonsten freigesetzte RNasen tätig werden können. Nach

Vermischen mit Extraktionspuffer werden Proteine, darunter auch RNasen, denaturiert und dadurch inaktiviert. Trotzdem sollte man möglichst alle Lösungen und Geräte vor der Verwendung autoklavieren und auch bei späteren Arbeitsschritten Kontaminationen mit RNasen vermeiden.

Auf die Inkubationszeit folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation. Dabei wurden unlösliche Zellbestandteile, Proteine und DNA abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und für eine Stunde auf Eis gekühlt, damit die RNA vollständig ausfallen konnte. Im Anschluss folgte 30-minütiges Zentrifugieren. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in umgedrehten Reaktionsgefäßen für 10 min. getrocknet.

Nach Zugabe von 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) wurde das Pellet auf Eis unter häufigem Aufwirbeln resuspendiert und nach Versetzen mit 100 µl Ethanol p.a. auf Eis für 20 Minuten ruhen gelassen. Beim anschließenden Abzentrifugieren (10 Minuten) konnten die Polysaccharide abgetrennt werden. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl 8 M LiCl versetzt und 90 Minuten oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die RNA zu sedimentieren, wurde 20 Minuten zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 80% Ethanol p.a. gewaschen, ca. 5 Minuten trocknen gelassen und in 50 µl dem. Wasser resuspendiert.

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde ein Teil der Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen, auf dem man später zwei starke Banden für die rRNA erkennen sollte.

6.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte mit dem RevertAid[®] First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas.

Hierbei wurden etwa 5 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primern vermischt und mit Nuclease-freiem Wasser auf 12 µl ergänzt. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurde die Lösung für 5 Minuten in einem 70°C heißen Wasserbad erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Der Reihe nach wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl) und 2 µl 10 mM dNTP Mix zupipettiert. Anschließend folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe von 1 µl RevertAid M-MuLV Reverser Transkriptase (200 U/µl), kurzem Mischen und Zentrifugieren erfolgte eine einstündige Inkubation bei 42°C.

Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten gestoppt und konnte für die PCR weiter verwendet werden.

6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA bzw. RNA wurden Agarosegele mit Konzentrationen von 0,5 bis 1% verwendet.

Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose eingewogen, mit TBE Puffer vermischt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde 10 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel zugesetzt und in einem Gelschlitten mit Probenkamm ausgegossen. Die Nucleinsäureproben wurden mit 5x Auftragepuffer versetzt, kurz zentrifugiert und in die Taschen des erkalteten Gels aufgetragen. Als Marker wurde meist der GeneRuler™ DNA Ladder Mix der Firma MBI Fermentas verwendet, der 21 DNA-Fragmente zwischen 100 und 10000 Basenpaaren enthält und somit ein breites Spektrum abdeckt.

Die Elektrophorese lief bei 90 – 130 mA bei Raumtemperatur.

Nach dem Lauf konnte das Gel unter UV-Licht betrachtet und zur Auswertung photographiert werden. Gegebenenfalls wurde die DNA-Bande von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 6.4 beschrieben weiterverarbeitet.

5x Probenpuffer:

0,01 %	Bromphenolblau
0,01 %	Xylencyanol
30 %	Glycerin

5x TBE Puffer:

54 g/l	Tris
27,5 g/l	Borsäure
4,65 g/l	EDTA

6.4 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Die Aufreinigung durch die unten aufgeführten Kits beruht auf der Tatsache, dass DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen an eine Silicamatrix bindet. Diese Salze dienen zur Entfernung der Hydrathülle der DNA, so dass diese an die Matrix binden kann. Nach einem Waschvorgang, bei dem Verunreinigungen entfernt werden, kann die DNA schließlich mit einem Puffer, der einen geringen Salzgehalt aufweist, von der Matrix abgelöst werden.

6.4.1 NucleoTrap[®] Gel Extraction Kit

Dieses von BD Biosciences Clontech hergestellte Kit benutzt eine Glasperlen-Suspension zur Abtrennung von DNA. Die sphärischen Glasperlen mit gleichmäßiger Größe und Form können Nucleinsäuren binden.

Der Nachteil dieser Methode gegenüber den folgenden liegt in dem relativ hohen Zeitaufwand und darin, dass oft die Glasperlen nicht vollständig entfernt werden konnten und somit in nachfolgende Ansätze verschleppt wurden.

Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit NT1-Puffer versetzt (300 µl Puffer je 100 mg Agarose). Danach wurden 10 – 30 µl der gut gemischten Glasperlen-Suspension hinzupipettiert und gut gevortext. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in dem Wasserbad so lange auf 50°C erwärmt und etwa alle 3 min. gevortext, bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. Dies dauerte etwa 10 – 20 Minuten.

Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10400 UpM konnte der Überstand verworfen werden und das Pellet zweimal mit jeweils 500 µl NT2 Puffer und darauf folgend zweimal mit je 500 µl NT3 Puffer gewaschen werden. Zum vollständigen Entfernen des NT3 Puffers erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 30 sec. und 10400 UpM bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet etwa 15 Minuten lang trocknen gelassen.

Zum Eluieren der DNA wurde das Pellet mit einer kleinen Menge TE-Puffer versetzt und alle 3 min. für eine Gesamtdauer von 10 min. bei Raumtemperatur gevortext. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend bei 10400 UpM für 30 sec. bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsvorgang wurde wiederholt und die Eluate vereinigt.

Um die DNA aufzukonzentrieren, folgte eine DNA-Fällung mit Ethanol. Dabei wurde die zu fällende DNA-Lösung mit dem 0,6-fachen Volumen an Ethanol p.a. versetzt und mindestens

für 3 Stunden auf Eis stehen gelassen bevor die DNA abzentrifugiert werden konnte (mindestens 30 min. und 13000 UpM).

6.4.2 Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System

Bei diesem System liegt die Silicamatrix zur Bindung der DNA in Form einer Membran in einer Zentrifugationseinheit vor. Diese Methode ist schneller als die Glasperlen-Aufreinigung und führt zu keiner Verschleppung der Matrix, brachte aber besonders bei größeren DNA-Stücken eine geringere Ausbeute.

Zu dem in einem Reaktionsgefäß befindlichen Agarosegelstückchen wurde 10 µl Membran-Binde-Lösung pro 10 mg Gelstück gegeben und bei 50-65°C unter häufigem Mischen inkubiert, bis sich das gesamte Gel gelöst hatte.

Anschließend wurde die Lösung auf eine SV Minisäule gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sie bei 16000 g bei 25°C für 60 sec. abzentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde verworfen.

Die Säule wurde zunächst mit 700 µl, dann mit 500 µl Membran-Wasch-Lösung gewaschen und zum Schluss zum Entfernen der Waschlösung für 1 Minute bei 13100 UpM zentrifugiert. Der Säuleneinsatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 50 µl sterilem dem. Wasser versetzt und für 1 min. stehen gelassen. Schließlich wurde für 1 Minute bei 13100 UpM zentrifugiert. Zum Konzentrieren der DNA folgte eine Isopropanol-Fällung. Dafür versetzte man die DNA-Lösung mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol p.a. und zentrifugierte nach kurzem Mischen bei 13000 UpM für mindestens 30 Minuten ab.

6.4.3 QIAquick® Gel Extraction Kit

Bei diesem Kit von Qiagen beruht die Bindung ebenfalls auf einer Silicagel Membran in einer Zentrifugationseinheit. Da für die DNA-Bindung ein pH-Wert von $\leq 7,5$ wichtig ist, enthält der QG Puffer einen Farbindikator, durch den der pH nach dem Lösen des Gels einfach überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden kann. Diese Methode ist schnell und führt zu guten Ausbeuten.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 3 Volumen QG Puffer vermischt und im Wasserbad bei 50°C zum Auflösen gebracht. Dabei wurde das Gefäß alle 2-3 min. gevortext. Nach einer gegebenenfalls nötigen Einstellung des pH-Wertes mit 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) auf einen pH von $\leq 7,5$ (gelber Farbumschlag) wurde die

Lösung mit einem Gelvolumen an Isopropanol vermischt und in eine Zentrifugations-säule pipettiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13000 UpM und Raumtemperatur wurde der Durchlauf entfernt, die Säule mit 750 µl PE Puffer gewaschen und anschließend die leere Zentrifugationseinheit erneut für 1 min. zentrifugiert (13000 UpM). Das Säulchen wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, mit 30-50 µl sterilem dem. Wasser oder EB Puffer versetzt und nach einer Wartezeit von einer Minute bei 13000 UpM für 60 sec. zentrifugiert.

6.5 Reinigung von DNA aus Verdau-Ansätzen oder PCR

6.5.1 NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel

Dieses System beruht auf dem gleichen Silicamembran Prinzip wie vorher bereits beschrieben. Es kann sowohl zur Aufreinigung aus Agarosegelen als auch zur DNA Reinigung aus flüssigen Ansätzen verwendet werden.

Die DNA-Probe wurde mit dem doppelten Volumen an NT Puffer gemischt, auf eine NucleoSpin® Säule pipettiert und bei 10900 UpM für 1 min. zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Entfernen des Durchflusses wurde die Säule mit 600 µl NT3 Puffer gewaschen und schließlich die Säule für 2 min. bei 10900 UpM getrocknet. Zum Eluieren der DNA wurde die Silicamembran mit 20-50 µl NE Puffer benetzt und nach einer Minute Inkubationszeit bei 10900 UpM abzentrifugiert.

6.6 Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurde Rotitransform® (Roth) verwendet. Hierzu wurde frisches LB-Medium mit einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 220 UpM bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4 - 1$ wachsen gelassen. 1,9 ml dieser Bakteriensuspension wurden bei 5700 UpM abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Bakterien in 100 µl kaltem LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 90 µl Rotitransform 1 Lösung und 10 µl Rotitransform 2 Lösung wurde das Ganze kurz vermischt und 5 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Danach konnten 5 - 12 µl eines Ligationsansatzes hinzupipettiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 45 - 60 Minuten auf Eis wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml bzw. einer Kanamycinkonzentration von 30 µg/ml ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen

gelassen. Besaß der Vektor die Möglichkeit einer Blau-Weiß-Selektion, so wurde zusätzlich auf die Platten jeweils 100 µl 0,1 M IPTG und 20 µl 50 mg/ml X-Gal ausgestrichen. Bei der Blau-Weiß-Selektion befindet sich eine für β -Galaktosidase codierende DNA-Sequenz im Vektor. Innerhalb dieser Sequenz liegt die Multiple Cloning Site (MCS), in der sich die Restriktionsenzymststellen zum Einfügen des DNA-Fragments befinden. Wurde kein Insert in den Vektor ligiert, so wird die β -Galaktosidase, durch IPTG induziert, vollständig exprimiert. Durch das Enzym wird das auf den Agarplatten ausgestrichene x-Gal hydrolysiert und oxidiert an der Luft zu einem blauen Farbstoff. Die resultierenden Bakterienkolonien sind an der blauen Farbe erkennbar. Bei einer erfolgreichen Ligation kann keine funktionsfähige β -Galaktosidase gebildet werden, da die Sequenz durch das Insert unterbrochen ist. Die wachsenden Bakterienkolonien bleiben weiß. Leider funktioniert dieses Selektionsverfahren nicht immer. Besonders bei kleinen eingefügten DNA-Fragmenten kann es fälschlicherweise zu blauen Kolonien kommen.

LB-Medium:

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agar wurde vor dem Autoklavieren 10 g/l Agar-Agar zugesetzt.

6.7 Anlegen einer Bakterien-Dauerkultur

75 µl steriles Glycerin wurde mit 425 µl einer Bakterien-Übernachtskultur vorsichtig vermischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.8 Plasmidextraktion

6.8.1 “Quick and Dirty“

Um zu kontrollieren, ob eine Transformation funktioniert hat und die gewünschte DNA in den Vektor eingebaut wurde, wurde eine schnelle Art der Plasmidextraktion gewählt, bei der die Sauberkeit von geringerer Bedeutung war.

Hierzu wurden 2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur abzentrifugiert und vom Medium befreit. Nach Zusatz von 0,2 ml P1 Puffer wurde das Pellet resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurde 0,2 ml P2 Puffer hinzugefügt und nach sanftem Vermischen für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml eiskalter P3 Puffer zupipettiert, gemischt und für 5 min. auf Eis gestellt. Danach wurde das Ganze bei 13000 UpM für 10 min. zentrifugiert, nochmals kurz gemischt und erneut für 10 min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 60 µl 3 M Natriumacetat und 420 µl Isopropanol zur DNA-Fällung versetzt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13000 UpM wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Zum Schluss wurde das getrocknete Pellet entweder in 20 µl Wasser gelöst oder direkt mit den entsprechenden Enzymen verdaut.

Puffer

P1 Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA
(Resuspendierungspuffer)	100 µg/ml RNase A
P2 Puffer	200 mM NaOH, 1% SDS
(Lysierungspuffer)	
P3 Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
(Neutralisierungspuffer)	

6.8.2 QIAGEN® Plasmid Kit mit QIAGEN-tip 20 Säulen

Dieses System besteht aus kleinen Säulchen, die mit einem Anionenaustauscher-Harz gefüllt sind, an das unter bestimmten Salz- und pH-Bedingungen Plasmid-DNA binden kann. Nach einem Waschschrift kann diese wieder mit einem Hochsalz-Puffer eluiert werden. Der

Durchfluss durch die Säulen erfolgt durch Schwerkraft. Die Säulen wurden nach einer gründlichen Reinigung wieder verwendet.

Der Anfang dieser Plasmidextraktion erfolgte wie die unter 6.9.1 beschriebene “Quick and Dirty“ Methode, nur mit 1,5 fachen Ansatz an Bakterienkultur und Puffern.

Der Überstand nach der insgesamt 20-minütigen Zentrifugation wurde auf ein mit QBT-Puffer äquilibriertes QIAGEN-tip 20 Säulchen gegeben und durchlaufen gelassen. Abschließend wurde die Säule viermal mit je 1 ml QC Puffer gewaschen und mit 0,8 ml QF Puffer eluiert.

Daraufhin erfolgte eine Isopropanol-Fällung durch Zusatz von 0,7-fachem Volumen Isopropanol p.a. und einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13000 UpM. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft für ca. 5 Minuten getrocknet und in sterilem dem. Wasser gelöst.

6.8.3 QIAprep[®] Miniprep Kit

Die QIAprep[®] Säulchen enthalten eine Silicagel Membran, an die unter Hochsalz-Bedingungen (Plasmid-) DNA binden kann. Nach einem Waschschrift erfolgt die Elution mit Wasser.

3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden bei 5000 UpM zentrifugiert und das Medium entfernt. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 250 µl P1 Puffer resuspendiert und mit 250 µl P2 Puffer versetzt. Nach ca. 6-maligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde die Mischung für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 350 µl N3 Puffer zugegeben und für 5 min. auf Eis gestellt. Schließlich wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine QIAprep[®] spin Säule gegeben und für 60 sec. zentrifugiert (13000 UpM, Raumtemperatur). Nach Entfernen des Durchflusses wurde die Säule mit 0,75 ml PE Puffer gewaschen und anschließend die Säule durch Zentrifugieren getrocknet. Der Säuleneinsatz wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 30-50 µl sterilem dem. Wasser versetzt. Die Säule wurde für eine Minute stehen gelassen und das DNA-haltige Eluat zum Schluss kurz abzentrifugiert.

6.9 Restriktionsverdau der Vektoren

6.9.1 pET-15b-Vektor

Der Vektor pET-15b wurde von der Firma Novagen bezogen. Er ist so gestaltet, dass er an den N-Terminus sechs Histidine anhängt, die zur späteren Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA benutzt werden können. Der so genannte His-Tag kann mittels Thrombin nach der Proteinexpression abgespalten werden. Einen Überblick über den Aufbau gibt die Vektorkarte im Anhang (VIII.A.1).

In der Multiple Cloning Site stehen nur drei Restriktionsschnittstellen zur Verfügung (*NdeI*, *XhoI* und *BamHI*).

6.9.1.1 Verdau mit *NdeI* und *BamHI*

Um DNA-Fragmente an den Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* einklonieren zu können, musste der zirkuläre Vektor zunächst mit den entsprechenden Enzymen verdaut werden. Die *NdeI*-Schnittstelle am N-Terminus des Proteins bietet den Vorteil, dass in der Schnittstelle ein Startcodon enthalten ist und so wenig Probleme auftauchen, das Insert in den richtigen Leserahmen einzuklonieren.

Der Vektor wurde zunächst nur mit *NdeI* verdaut, da dieses Restriktionsenzym DNA langsamer schneidet und an DNA-Enden sehr schlecht arbeitet. So wurde der unten aufgeführte Ansatz zusammengegeben und für 16-17 Stunden zunächst nur mit *NdeI* bei 37°C verdaut und nach Zugabe von *BamHI* für 3 Stunden weiter verdaut.

6,5	µl	pET-15b-Vektor 0,5 µg/ml
3	µl	R ⁺ -Puffer
2	µl	<i>NdeI</i>
1	µl	<i>BamHI</i> , Zugabe erst nach 17 Stunden
17,5	µl	dem. Wasser

Anschließend wurden 0,2 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP) zugegeben und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die CIP spaltet die Phosphatreste an den Vektorenden ab und verhindert dadurch eine Religation des Vektors, sollte ein Restriktionsenzym nicht richtig geschnitten haben.

Um die Enzyme und kurzen DNA-Fragmente aus dem Ansatz zu entfernen, wurde alles über eine QIAquick[®] Säule aufgereinigt.

6.9.1.2 Verdau mit *NdeI*

Der zirkuläre Vektor wurde in diesem Fall mit nur einem Restriktionsenzym aufgeschnitten. Der Verdau bestand aus den unten angegebenen Bestandteilen und wurde für 18 Stunden bei 37°C verdaut.

6,5	μl	pET-15b-Vektor 0,45 μg/ml
3	μl	R ⁺ -Puffer
2	μl	<i>NdeI</i>
18,5	μl	dem. Wasser

Nach Beendigung des Verdaus wurden 0,2 μl CIP zum Entfernen der Phosphatreste an den beiden 5'-Enden des Vektors hinzu gegeben und für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine QIAquick[®] Säule aufgereinigt.

6.9.2 pET-24d-Vektor

Der pET-24d-Vektor enthält ebenfalls eine His-Tag codierende Sequenz, allerdings wird dieser an den C-Terminus angehängt. In der Multiple Cloning Site stehen acht Restriktionsschnittstellen zur Verfügung (vgl. Vektorkarte im Anhang VIII.A.2).

Der pET-24d-Vektor lag als Vektor in *E. coli* TOP10 Bakterien vor und musste zunächst mit Hilfe des QIAprep[®] Kits aus einer Übernachtskultur isoliert werden.

Der Verdau erfolgte nach unten aufgeführter Zusammensetzung für 2 Stunden bei 37°C.

20	μl	pET-24d-Vektor
6	μl	Y-Tango-Puffer
1	μl	<i>SalI</i>
1	μl	<i>NcoI</i>
2	μl	dem. Wasser

Zum Dephosphorylieren wurden 0,2 µl CIP hinzu gegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über einem Agarosegel aufgetrennt, die pET-24d Bande ausgeschnitten und mit QIAquick® Säulen aufgereinigt.

6.10 DNA Sequenzierung

Isolierte Plasmide wurden entweder im Institut für Zellbiologie und Angewandte Botanik, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg von Dr. S. Zauner sequenziert oder an die Firma MWG-Biotech AG (Martinsried, Deutschland) zum Sequenzieren eingeschickt.

7 Klonierung der H(P)PR aus *Coleus* Zellkulturen

7.1 cDNA Synthese

Die cDNA wurde wie unter 6.2 beschrieben mit dem RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas aus RNA von 5 und 7 Tage alten Zellkulturen von *Coleus blumei* hergestellt (jeweils 2,5 µl, 1 mg/ml RNA).

7.2 Klonierung der H(P)PR-cDNA in den pET-15b-Vektor

7.2.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte mit dem Expand High Fidelity PCR-System der Firma Roche. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden der Reihe nach die unten aufgelisteten Reagenzien zusammenpipettiert und mit dem angegebenen Programm im Robocycler von Stratagene inkubiert.

35,5 µl	Wasser ad inject.
5 µl	10 x PCR Puffer mit MgCl ₂ (15 mM)
1 µl	MgCl ₂ 25mM

1 µl	Col-HPPR-F2 – Primer 5'-GGAATTCCATATGGAGGCGATTGGCGTTTTGATG-3'
1 µl	Col-HPPR-R – Primer 5'-CAGGATCCTATCAAACACTGGAGTTAAGAGAG-3'
1 µl	dNTPs 10 mM
5 µl	cDNA <i>Coleus blumei</i>
0,5 µl	Taq DNA Polymerase

PCR-Programm:

Zyklen	Temperatur	Zeit
39	95°C	1 min
	58°C	2 min
	72°C	2 min
1	95°C	1 min
	58°C	5 min
	72°C	10 min

Anschließend wurden die PCR-Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und mit Nucleotrap[®] Säulen aufgereinigt. Zum Aufkonzentrieren der DNA wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

7.2.2 Ligation in den pGem[®]T-Vektor

Der pGem[®]T-Vektor (Promega) ist speziell für das Einligieren von PCR-Produkten entwickelt worden und enthält eine einzelne überhängende Thymidin-Base an beiden 3'-Enden. Dieses System nutzt aus, dass während der PCR durch einige thermostabile Polymerasen an das 3'-Ende ein Deoxyadenosin angehängt wird. So können die bei der PCR vervielfältigten DNA-Stücke direkt und ohne weiteren Enzymverdau in den pGem[®]T-Vektor einligiert werden.

Nach Zusammenmischen der unten angegebenen Bestandteile erfolgte die Ligation in einer Styroporbox im Kühlschrank bei 4°C über Nacht und anschließend bei Raumtemperatur für 3,5 Stunden.

0,6 µl	Wasser nucleasefrei
5 µl	2 x Rapid Ligation Buffer
1 µl	pGem [®] T-Vektor 50 ng/µl (Promega)
0,4 µl	gereinigtes PCR-Produkt
3 µl	T4-DNA-Ligase

7.2.3 Transformation in *E. coli* JM109

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde mit einem Aliquot frisch kompetent gemachter *E. coli* JM109 Zellen vermischt und nach 1 Stunde auf Eis auf LB-Agar-Platten, die mit Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (118 µg/ml) und X-Gal (80 µg/ml) bestrichen wurden, ausplattiert.

Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht konnten die erfolgreich transformierten Bakterien, die an ihrer weißen Koloniefarbe erkennbar waren, als Dauerkulturen angelegt und weiter untersucht werden. In einer Kolonie konnte nach der Sequenzierung die bekannte H(P)PR-Sequenz identifiziert werden.

7.2.4 Isolierung der H(P)PR-DNA aus dem pGem[®]T-Vektor

Von den erfolgreich transformierten Bakterien wurde eine Übernachtskultur angesetzt, und nach dem “quick and dirty“ Verfahren konnten die Plasmide isoliert werden. Um die H(P)PR-cDNA zu gewinnen, wurde das Insert durch einen Plasmid-Verdau an den eingeführten Schnittstellen für *Nde*I und *Bam*HI herausgeschnitten. Dabei wurde über Nacht zunächst nur mit *Nde*I verdaut (ca. 16 Stunden bei 37°C), da dieses wesentlich langsamer und schlecht an Enden schneidet und keine Star-Aktivität besitzt. Am nächsten Morgen wurde *Bam*HI zugegeben und für 3 Stunden weiter verdaut.

Verdauansatz:

20 µl	Plasmid-DNA
3 µl	R ⁺ Puffer 10 x
0,5 µl	<i>Nde</i> I
0,5 µl	<i>Bam</i> HI, Zugabe erst am nächsten Morgen
6 µl	dem. Wasser

Der Verdau wurde auf einem Agarosegel aufgetragen, und nach erfolgter Trennung der DNA konnte die H(P)PR-Bande bei ca. 1000 bp herausgeschnitten und wie unter 6.4.2 beschrieben aufgereinigt werden.

7.2.5 Ligation in den pET-15b-Vektor

Für die Ligation wurden die unten aufgeführten Bestandteile vermischt und über Nacht in einer Styroporbox zum langsamen Abkühlen bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für etwa 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

11 µl	H(P)PR-Insert
5 µl	pET-15b-Vektor, verdaut
2,5 µl	10 x Ligasepuffer
2,5 µl	dem. Wasser
4 µl	T4-DNA-Ligase

7.2.6 Transformation in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zu einem Aliquot kompetenter *E. coli* JM109 Bakterien gegeben, nach sanftem Vermischen auf Eis für 1 Stunde stehen gelassen und anschließend auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

Nach Identifizierung erfolgreich transformierter Klone durch Isolieren und Verdauen der Plasmide wurden diese an der Philipps-Universität, Fachbereich Biologie, sequenziert.

Von einem Klon wurde das Plasmid isoliert und in mit Rotitransform[®] kompetent gemachte BL21(DE3)pLysS *E. coli* Bakterien eingebracht. Dieses Bakterium ist ein spezieller Expressionswirtsorganismus (vgl. 11.1). Aus den so transformierten Bakterienkulturen konnte nach Induktion das H(P)PR-Protein gewonnen werden (siehe 11).

7.3 Klonierung der H(P)PR-cDNA in den pET-24d-Vektor

7.3.1 PCR

Die PCR wurde mit dem in den pET-15b einklonierten H(P)PR-Insert als Vorlage angesetzt. Dazu wurde das Plasmid isoliert und zu dem PCR-Ansatz pipettiert. Die Pufferlösungen und die Polymerase stammten von der Firma Bioline. Die Reaktion wurde im Robocycler der Firma Stratagene durchgeführt.

35 µl	Wasser ad inject.
5 µl	10 x Puffer mit MgCl ₂ (Bioline)
1 µl	MgCl ₂ 50mM (Bioline)
1 µl	Col-HPPR-F1 – Primer 5'-GGA ACC ATG GAG GCG ATT GGC GTT TTG ATC -3'
1 µl	Col-HPPR-R2 – Primer 5'-GAT GTC GAC AAC TAC TGG AGT TAA GAG AGG C -3'
2 µl	dNTP 10 mM
3 µl	Isolierter pET15b Vektor mit H(P)PR-Insert
2 µl	AccuSure DNA Polymerase (Bioline)

Das PCR-Programm entsprach den unter 7.2.1.1 angegebenen Bedingungen. Nach Auftrennen auf einem Agarosegel wurden die ausgeschnittenen Banden mit dem QIAquick[®] Kit aufgereinigt (6.4.3).

7.3.2 Verdau und Ligation in den pET-24d-Vektor

Der Verdau erfolgte mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NcoI* für 2,5 Stunden bei 37°C mit der unten angegebenen Zusammensetzung.

30 µl	DNA
8 µl	Y Tango Puffer 10 x
1 µl	<i>SalI</i>
1 µl	<i>NcoI</i>

Der Verdau wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Kit aufgereinigt. Das erhaltene Eluat wurde für die Ligation verwendet.

Die Ligation erfolgte bei 4°C in einer Styroporbox über Nacht.

10	µl	H(P)PR-DNA
7	µl	pET-24d-Vektor
2,5	µl	10 x Ligasepuffer
1,5	µl	Wasser
4	µl	T4-DNA-Ligase

7.3.3 Transformation in TOP10 Zellen

Für die Transformation wurden die bereits kompetenten *E. coli* Bakterien OneShot[®] TOP10 der Firma Invitrogen verwendet.

Zu je einem Aliquot kompetenter TOP10 Bakterien wurde ein halber Ligationsansatz hinzugegeben und für 30 min. auf Eis ruhen gelassen. Nach 30 Sekunden Inkubation bei 42°C wurde 250 µl S.O.C. Medium hinzugefügt und eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakterienlösung auf LB-Platten mit Kanamycin (30 µg/ml) ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C inkubiert.

Die Plasmide der gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit QIAprep[®] Säulen isoliert und bei MWG-Biotech AG (Martinsried, Deutschland) sequenziert.

S.O.C. Medium:

2	%	Trypton
0,5	%	Hefeextrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄
20	mM	Glucose

7.3.4 Transformation in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Das Plasmid mit dem H(P)PR-Insert wurde mit Hilfe der QIAprep[®] Säulen isoliert und in kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert.

8 Klonierung der H(P)PR aus *Coleus blumei* Pflanzen

8.1 mRNA Isolierung und cDNA Synthese

Die RNA wurde aus zwei unterschiedlichen *Coleus blumei* Pflanzen (*Coleus* M und *Coleus* V6) nach Giuliano et al. (1993) isoliert (6.1). Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) eingesetzt (6.2).

8.2 H(P)PR aus *Coleus* M

8.2.1 PCR

Die Zusammensetzung der PCR-Amplifikationsansätze ist unten angegeben. Die Reaktion erfolgte im PCR-Mastercycler der Firma Eppendorf.

39,5 µl	Wasser ad inject.
5 µl	10 x Puffer mit MgCl ₂
1 µl	Col-HPPR-F2 – Primer 5'-GGAATTCCATATGGAGGCGATTGGCGTTTTGATG-3'
1 µl	Col-HPPR-R – Primer 5'-CAGGATCCTATCAAACACTACTGGAGTTAAGAGAG-3'
1 µl	dNTPs 10 mM
2 µl	cDNA <i>Coleus blumei</i> M
0,5 µl	Taq DNA Polymerase

Die PCR-Proben wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und mittels QIAquick[®] aufgereinigt. Nach einem Verdau mit *NdeI* über Nacht, wurde *BamHI* zugegeben und für weitere 3 Stunden verdaut.

8.2.2 Verdau

20 µl	Plasmid DNA
3 µl	R ⁺ Puffer 10 x
0,5 µl	<i>NdeI</i>
0,5 µl	<i>BamHI</i> , Zugabe erst am nächsten Morgen
6 µl	dem. Wasser

Der Verdau wurde ohne vorherige Auftrennung über ein Agarosegel mit dem Wizard[®] Kit gereinigt und konnte daraufhin in den pET-15b-Vektor einkloniert werden.

8.2.3 Ligation in den pET-15b-Vektor

4 µl	H(P)PR-Insert
1 µl	pET-15b-Vektor
1,5 µl	10 x Ligasepuffer
5,5 µl	dem. Wasser
3 µl	T4-DNA-Ligase

8.3 H(P)PR aus *Coleus* V6

8.3.1 PCR

Die PCR entspricht der Zusammensetzung unter 7.3.1. Es wurden 3 µl cDNA von *Coleus* V6 als Vorlage eingesetzt.

8.3.2 Verdau

30 µl	Plasmid DNA
8 µl	Y Tango 10 x
1 µl	<i>SalI</i>
1 µl	<i>NcoI</i>

Der Verdau wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die 1000 bp Banden ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Kit aufgereinigt. Das Eluat wurde für die Ligation weiter verwendet.

8.3.3 Ligation in den pET-24d-Vektor

10	μl	H(P)PR Coleus V6 Insert
7	μl	pET-24d-Vektor
2,5	μl	10 x Ligasepuffer
1,5	μl	dem. Wasser
4	μl	T4-DNA-Ligase

8.4 Transformation

Für die Transformation wurden bereits kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien der Firma Invitrogen verwendet. Die Transformation erfolgte analog 7.3.3.

9 Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus *Arabidopsis thaliana*

9.1 cDNA Synthese

Als Vorlage für die cDNA-Synthese wurde mRNA verwendet, die nach der Methode von Giuliano et al. (1993) (6.1) aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen gewonnen wurde. Für die cDNA-Synthese fand das RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas Anwendung (6.2).

9.2 PCR

Zwei Parallelansätze wurden nach unten angegebener Zusammensetzung angesetzt. Es wurde das Expand High Fidelity PCR-System von Roche verwendet. Da das Gen aus *Arabidopsis* eine interne Schnittstelle für *Bam*HI enthielt, wurde durch beide Primer sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eine *Nde*I Schnittstelle eingeführt. Die Reaktion erfolgte im Robocycler.

PCR-Ansatz:

39,5 µl	Wasser ad inject.
5 µl	10 x Puffer mit MgCl ₂
1 µl	MgCl ₂ 25mM
1 µl	Ara-1f-neu – Primer 5'-GGAATTCCATATGGAATCAATCGGAGTCCTTATGAT-3'
1 µl	Ara-2r-neu – Primer 5'-AGTCATATGCTATCAGACGACCGGAGTCAGAAGTG-3'
1 µl	dNTP 10 mM
2 µl	cDNA von <i>Arabidopsis thaliana</i>
0,5 µl	Taq DNA Polymerase

Die DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die 1000 bp Bande ausgeschnitten und wie unter 6.4.3 angegeben mit dem QIAquick[®] Kit von Qiagen aufgereinigt.

Die gereinigte DNA wurde über Nacht mit *Nde*I verdaut:

30 µl	DNA
3,5 µl	R ⁺ -Puffer 10 x
1 µl	<i>Nde</i> I
0,5 µl	dem. Wasser

Zum Abtrennen von kleineren DNA-Stückchen, Enzymen und Puffern wurde der Verdau über eine QIAquick[®] Säule aufgereinigt.

9.3 Ligation in den pET-15b-Vektor

Die Ligation erfolgte in einem Styroporgefäß über Nacht bei 4°C.

13,5 µl	DNA
5 µl	pET-15b-Vektor
2,5 µl	10 x Ligasepuffer
4 µl	T4-DNA-Ligase

9.4 Transformation in JM109

Zu einem Aliquot kompetenter *E. coli* JM109 Bakterien wurde ein halber Ligationsansatz hinzu gegeben, für 1 Stunde auf Eis inkubiert, und auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Geeignete Klone wurden durch Plasmid-Isolierung und -Verdau identifiziert und beim Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg sequenziert.

9.5 Transformation in BL21(DE3)pLysS

Isolierte Plasmide von erfolgreich transformierten Bakterien wurden in kompetente BL21(DE3)pLysS Bakterien transformiert.

10 Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus *Solanum melongena* (Aubergine) und *Capsicum annuum* (Paprika)

10.1 cDNA Synthese

Die Gewinnung der RNA erfolgte wie unter 6.1 beschrieben nach Giuliano et al. (1993) aus Paprika- bzw. Auberginen-Früchten aus dem Supermarkt. Mit dem RevertAid[®] First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas wurde daraufhin die cDNA-Synthese durchgeführt (6.2).

10.2 PCR

Für die Polymerase Ketten Reaktion wurde das Expand High Fidelity PCR-System von Roche und das Eppendorf PCR-Gerät verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Proben ist unten angegeben. Es wurden Primer eingesetzt, die für ein H(P)PR-ähnliches Enzym aus Tomate (Acc. No. EMBL BT013950) entworfen worden waren.

PCR-Ansatz:

39,5 µl	Wasser ad inject.
5 µl	10 x Puffer mit MgCl ₂
1 µl	Lyc 3 – Primer 5'-GGAATTCCATATGGAAAGCATCGGAGTATTGATG-3'
1 µl	Lyc 5rc – Primer 5'-CAGGATCCTATTAAACCACTGGAGTTAACAGCG-3'
1 µl	dNTP 10 mM
2 µl	cDNA von Aubergine bzw. Paprika
0,5 µl	Taq DNA Polymerase

Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Kit (6.4.3) aufgereinigt.

10.3 Verdau und Ligation

Für den Verdau der DNA-Inserts wurden die angegebenen Mengen zusammenpipettiert (außer *Bam*HI) und zunächst nur mit *Nde*I über Nacht und nach *Bam*HI-Zugabe für weitere 3 Stunden verdaut.

15 µl	aufgereinigte Insert DNA
2 µl	R ⁺ -Puffer 10 x
0,5 µl	<i>Nde</i> I
0,5 µl	<i>Bam</i> HI, Zugabe erst am nächsten Morgen
2 µl	dem. Wasser

Die Ansätze wurden nach vollendetem Verdau mit dem Wizard[®] Kit (6.4.2) aufgereinigt und die eluierte DNA für eine Ligation verwendet. Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Ligationsansatz :

11 µl	DNA-Insert
2 µl	pET-15b-Vektor
2,5 µl	10 x Ligasepuffer
5,5 µl	dem. Wasser
4 µl	T4-DNA-Ligase

10.4 Transformation

Zu jedem Ligationsansatz wurde ein Aliquot an kompetenten JM109 Bakterien pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde auf Eis wurden die Transformationsansätze auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformanten wurden auf erfolgreichen Einbau der Insert-DNA mittels Plasmid-Isolierung und Verdau untersucht. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma MWG Biotech AG (Martinsried, Deutschland).

11 Induktion und Proteinreinigung

11.1 *E. coli* BL21(DE3)pLysS Expressionsstamm

Der *Escherichia coli* Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS dient im Gegensatz zu den anderen verwendeten *E. coli* Stämmen JM109 und TOP10 speziell der Proteinexpression.

Ein Expressionsstamm zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass die Fremdprotein-Produktion steuerbar/induzierbar ist (in diesem Fall mit IPTG). Dies ist besonders wichtig, da Fremdproteine für das Bakterium toxisch sein können und ihre Vermehrung dadurch von vornherein gehemmt oder gar ausgeschlossen sein kann.

Um dennoch eine gute Proteinausbeute zu gewährleisten, lässt man die Bakterien zunächst wachsen und induziert ab einer bestimmten Bakteriendichte die Proteinexpression. Im BL21(DE3)pLysS Bakterium geschieht diese Steuerung durch ein in das Bakterienchromosom eingebautes DE3 Lysogen des Bakteriophagen DE3. Das Lysogen besteht aus einem *lacUV5* Promotor, der durch IPTG induzierbar ist und ein nachfolgendes

T7-RNA-Polymerase-Gen steuert. Der Vektor (z.B. pET-15b) besitzt meist einen *T7lac*-Promotor, der, sobald T7-RNA-Polymerase bindet, die Transkription des einligierten Fremdgens startet. Um also die Produktion des Fremdproteins zu verhindern, muss die Transkription der T7-RNA-Polymerase verhindert werden. Dies geschieht über den *lacUV5* Promotor, der u. a. durch das Protein *lac*-Repressor inhibiert wird. Dieser *lac*-Repressor wird sowohl im Bakterienchromosom als auch in manchen Fällen im Vektor codiert. Dadurch wird ständig dieses hemmende Protein gebildet und verhindert durch Bindung an den *lacUV5* Promotor (im Bakterienchromosom) und auch zusätzlich an den *T7lac*-Promotor (im Vektor) die Transkription des nachfolgenden Gens.

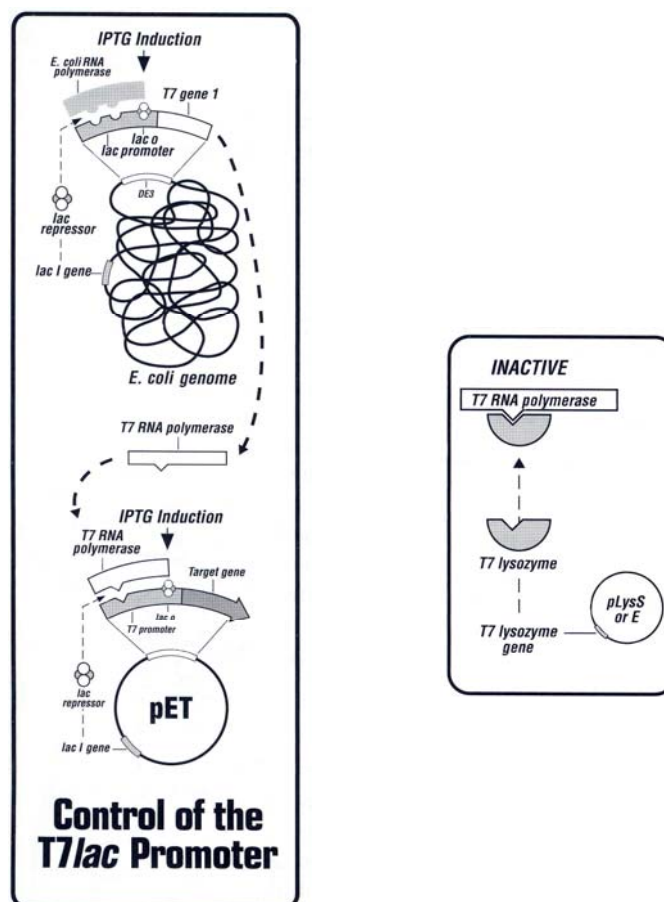


Abb. 14: Regulierung der Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (aus der Gebrauchsanweisung für pET-Vektoren).

Sollte dennoch etwas T7-RNA-Polymerase gebildet werden, was sich nicht verhindern lässt, so besitzt das BL21(DE3)pLysS Bakterium einen Vektor (pLysS), der für ein T7-Lysozym kodiert und dieses auch ständig in geringen Mengen produziert. Dieses Protein bindet an T7-RNA-Polymerase und inaktiviert es dadurch.

Damit ist sichergestellt, dass sich Bakterien vermehren können, ohne durch das Fremdprotein beeinflusst zu werden. Soll die Fremdprotein-Expression induziert werden, gibt man IPTG dem Medium zu, das, einmal in die Bakterienzellen aufgenommen, den *lac*-Repressor derart verändert, dass er nicht mehr an die Promotoren binden kann. Die Expressionshemmung ist damit sowohl am *lacUV5* als auch am *T7lac*-Promotor aufgehoben und das Fremdprotein kann exprimiert werden.

Da Laktose ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf das *lac*-Operon besitzt, sollte für genügend Glucose im Bakterienmedium gesorgt werden, solange keine Fremdprotein-Expression erwünscht ist. Glucose wird vom Bakterium bevorzugt als Energiequelle akzeptiert. Durch Umsetzung von Glucose wird der intrazelluläre cAMP-Spiegel niedrig gehalten, welches für eine Aktivierung des *lac*-Operons benötigt wird.

11.1.1 Induktion mit IPTG

Frisches LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) wurde mit 1/10 Volumen einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Dichte von $A_{600} = 0,7 - 1,0$ unter Schütteln (220 UpM) bei 37°C wachsen gelassen. Nach Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) mit einer Endkonzentration von 1 mM wurden die Bakterien für 3 – 5 Stunden inkubiert (37°C, 220 UpM).

11.2 Aufschluss der Bakterien

Die induzierten Bakterien wurden bei 4°C und 7000 UpM abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 20 mM Tris/HCl Puffer pH 8,2 gewaschen und bei -80°C gelagert.

Um das Protein zu gewinnen, wurde das Bakterienpellet in Bindepuffer (50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) resuspendiert (3-10 ml Puffer pro g Bakterienpellet) und auf Eis bei 0,6 cycles, 100% für viermal 15 Sekunden aufgeschlossen (UP 200S Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH). Anschließend erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 UpM. Der entstandene Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert und zum Aufreinigen des Proteins mittels Ni-NTA Matrix verwendet.

11.3 Aufreinigung des Proteins über Metallchelate-Chromatographie

Bei dieser Trennmethode handelt es sich um eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC). Nitrilotriessigsäure (NTA) ist an eine Matrix gebunden und komplexiert Ni^{2+} Ionen an vier Stellen. An den zwei freiliegenden Stellen des Nickels kann nun Histidin binden, das mittels spezieller Vektoren in Form von meist sechs Histidinen (His-Tag) an das zu reinigende Protein angehängt wurde (vgl. Abbildung 15). Protein, das nicht binden kann, wird entfernt und schließlich kann das His-Tag-Protein mittels hoher Konzentrationen an Imidazol aus der Bindung an die Matrix verdrängt und damit eluiert werden.

Das mittels Ni-NTA aufgereinigte Protein wurde entweder direkt für Enzymtests oder nach weiterer Aufreinigung für die Proteinkristallisation verwendet.

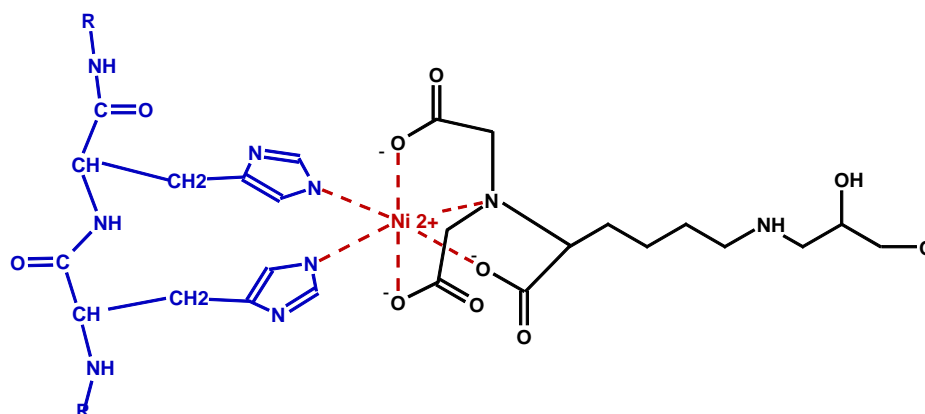


Abb. 15: Schema der Histidin Bindung an die Ni-NTA Matrix.

11.3.1 Reinigung über eine Ni-NTA-Säule

Der Proteinüberstand wurde auf eine mit Bindepuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule gespült. Danach wurde so lange mit Waschpuffer gewaschen, bis die Absorption konstant war. Anschließend konnte das gebundene Protein mit Elutionspuffer von der Säule gelöst werden. Die Proteinfraktion wurde aufgefangen und sofort mit PD10 Säulen auf den entsprechenden Phosphatpuffer umgepuffert, je nachdem, ob das Protein für die Enzymcharakterisierung oder eine weitere Aufreinigung über eine 2'5'-ADP-Sepharose-Säule verwendet wurde.

Säule:	Ni-NTA (Qiagen)
Säulenvolumen:	8,9 ml
Bindepuffer :	K-Phosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer:	K-Phosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	K-Phosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min

11.3.2 Reinigung mit Hilfe des Ni-NTA Batchverfahrens

Der Proteinüberstand wurde mit 1 ml Ni-NTA Superflow Harz der Firma Novagen vermischt und für 60 Minuten auf Eis geschüttelt (200 UpM). Anschließend wurde die Mischung in eine leere PD10 Säule gegeben und die Proteinlösung durchlaufen gelassen. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 2 ml Waschpuffer wurde das Protein mit 4 x 0,5 ml und 1 x 1 ml Elutionspuffer eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von PD10 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) umgepuffert.

11.4 Reinigung über 2'5'-ADP-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech)

2'5'-ADP ist ein Analogon der Cofaktoren NAD bzw. NADP und dient speziell der Aufreinigung von NAD(P)⁺-abhängigen Dehydrogenasen, die an die Matrix binden können. Mit steigender Ionenstärke können gebundene Proteine wieder abgelöst werden. Eine Elution kann auch durch pH- oder Temperaturveränderung erreicht werden.

Das über seinen His-Tag gereinigte Protein wurde zunächst mittels PD10 Säulen auf Puffer A umgepuffert, bevor es auf die mit Puffer A äquilibrierte 2'5'-ADP-Sepharose Säule gespült wurde. Daraufhin wurde die Säule mit 16 ml Puffer A gewaschen, und anschließend erfolgte eine Elution des Proteins mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in Puffer A. Das so erhaltene Protein konnte nach Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,0 (siehe 13.1) für Kristallisationsansätze verwendet werden.

Säule:	2'5'-ADP-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen:	3,53 ml
Puffer A :	10 mM K-Phosphat, pH 6,5; 1 mM DTT
Puffer B:	10 mM K-Phosphat, pH 6,5; 1 mM DTT; 1 M NaCl
Elutionspuffer:	K-Phosphat, pH 8,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Programm:	0-16 min A 100 % 16-46 min A 100 % -> A 0 %, B 0 % -> B 100 % 46-60 min B 100 %
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min

11.5 Abspaltung des His-Tags

Für die Abspaltung des His-Tags wurde das Thrombin CleanCleave™ Kit von Sigma-Aldrich verwendet. Im H(P)PR-Protein befindet sich zwischen der HPPR-Nukleotidsequenz und dem His-Tag eine Thrombin-Schnittstelle, die es ermöglicht, den His-Tag abzuspalten.

Zunächst wurden 2,5 µl H(P)PR-Protein (1,4 mg/ml) mit Hilfe einer PD10 Säule auf Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM CaCl₂) umgepuffert. 300µl der Thrombin-Agarose wurden mit Reaktionspuffer gewaschen und mit dem Protein vermischt. Unter öfterem Vermengen wurde diese Mischung bei 4 °C für 7 Tage inkubiert und anschliessend über 1ml Ni-NTA Superflow Harz der Firma Novagen aufgereinigt. Dabei bindet der abgespaltene His-Tag und eventuell Protein, bei dem der His-Tag nicht abgespalten wurde, an der Ni-NTA Matrix. His-Tag freies Protein kann nicht an der Matrix binden. Die Durchlauf-Fraktion wurde auf Kpi Puffer, pH 7,0 umgepuffert und auf Enzymaktivität getestet.

12 Methoden zur Charakterisierung der H(P)PR

12.1 Enzymtest mit Auswertung über HPLC

Der Standardtest setzte sich wie unten angegeben zusammen. Das Wasserbad wurde auf 37°C vorgeheizt und die Proben für 3 min vorgewärmt, bevor die Reaktionen durch Enzymzugabe gestartet wurden.

160 µl	0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0
10 µl	Ascorbat 1 mM
10 µl	DTT 0,1 M
10 µl	NADPH 50 mM
10 µl	pHPP 25 mM
50 µl	H(P)PR Enzym

Nach einer Standardreaktionszeit von 10 min. wurden die Proben durch Zusatz von 50 µl 6 N HCl gestoppt.

Anschließend wurden die Proben dreimal mit jeweils 0,5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetat-Phasen vereinigt und über Nacht eingedampft.

12.1.1 HPLC-Analyse

Die eingedampften Proben wurden mit jeweils 50 – 200 µl 10% angesäuertem Methanol (siehe unten) aufgenommen und für eine Minute im Ultraschallbad inkubiert. Vor der Analyse wurden die Proben 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Zur Vermessung der Proben standen zwei HPLCs zur Verfügung, wobei meist die Kontron HPLC zum Einsatz kam.

Säule:	Hypersil ODS, GROM Analytik und HPLC GmbH, Herrenberg
Säulenvolumen:	250 x 4 mm
Fließmittel:	10% Methanol, 0,01% H ₃ PO ₄
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min
Detektion:	280 nm

Um die Umsatzmenge zu berechnen, wurde 100 µM pHPL als externer Standard verwendet.

12.2 Photometrischer Enzymtest

Da einige Substrate bzw. deren Produkte aufgrund mangelnder Absorption nicht über HPLC erfasst werden konnten, wurde für diese Enzymtests das Photometer verwendet.

Bei dieser Methode nutzt man aus, dass NADPH/NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert. Da das Cosubstrat zu $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ oxidiert wird, kann man die Umsetzung als Abnahme der Absorption messen und indirekt auf die Reduktion des Substrates schließen.

Normalerweise werden diese Photometertests bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt. Da bei dieser Wellenlänge allerdings einige Substrate ebenfalls absorbierten und die absolute Absorption nicht mehr im linearen Messbereich lag, wurden diese Enzymtests bei 380 nm vermessen. Die Tests wurden bei 37°C durchgeführt und bestanden im Allgemeinen aus folgenden Komponenten:

250 µl	0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0
40 µl	NADPH 12,5 mM
10 µl	Substrat
20 µl	H(P)PR [3,75 µg/ml bis 1,5 mg/ml]
ad 500 µl	dem. Wasser

Nach einer Vorwärmzeit von 3 Minuten wurde mit Zugabe des Substrates die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte für 2 Minuten alle 12 Sekunden.

12.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenbestimmung der H(P)PR wurde mit Hilfe einer Superformance Säule mit einem Säulenvolumen von 117 ml durchgeführt, die mit Fractogel EMD Bio SEC (Merck, Darmstadt) gefüllt war. Dieses Säulenmaterial ist ein hydrophiles Polymethylacrylat mit einer Partikelgröße von 20 – 40 µm und einem Porendurchmesser von 500 – 800Å.

Zunächst wurde die Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen an SEC-Puffer equilibriert, bevor das H(P)PR-Protein auf die Säule gegeben wurde. Die Flussrate betrug 1 ml/min mit SEC-Puffer als Fließmittel. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt und später auf Aktivität getestet.

SEC-Puffer:

50 mM	Tris-HCl pH 7,5
10 %	Glycerin
0,5 mM	EDTA
2 mM	DTT

Durch Vermessen von 5 Referenzproteinen (Gel Filtration LMW Calibration Kit, Amersham Biosciences, Braunschweig) konnte eine Kalibrierkurve erstellt werden. An dieser konnte anschließend das Molekulargewicht des H(P)PR-Proteins abgelesen werden. Die Referenzproteine setzten sich wie folgt zusammen:

Molekulargewicht [kDa]	Protein
150	Alkoholdehydrogenase
67	Rinderserumalbumin (BSA)
45	Ovalbumin
29	Carboanhydrase
13,7	Ribonuklease A

12.4 Untersuchung der Chiralität des gebildeten pHPLs

Der Enzymtest wurde zunächst mit pHPP als Substrat, wie unter 12.1 beschrieben, durchgeführt.

Die eingedampften Proben wurden anschließend über die HPLC aufgetrennt (12.1.1) und die entsprechenden pHPL-Peaks aufgefangen. Um die gesammelten Fraktionen möglichst schonend einzuengen, wurden diese vereinigt und gefriergetrocknet. Auf Ausschütteln mit Ethylacetat wurde verzichtet, da Spuren des Lösungsmittels die chirale Säule schädigen können.

Ein Teil des Rückstands wurde in 10%igem Methanol rückgelöst und unter den Standardbedingungen (12.1.1) auf Reinheit und Identität überprüft.

Der Rest wurde in n-Hexan / 2-Propanol (90:10) gelöst und mit Hilfe einer chiralen Säule aufgetrennt. Dabei wurde die Säule Chiralcel OD der Firma Daicel Chemical Industries, (Illkirch, Frankreich) verwendet.

Die Säule ist mit Cellulose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) gefüllt, einem Cellulose-derivat, das an Silikagel adsorbiert ist (siehe Abbildung 16). Der Auftrennungsmechanismus wird als eine Kombination von Einschlusskomplexierung und Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermutet (Müller, 2006).

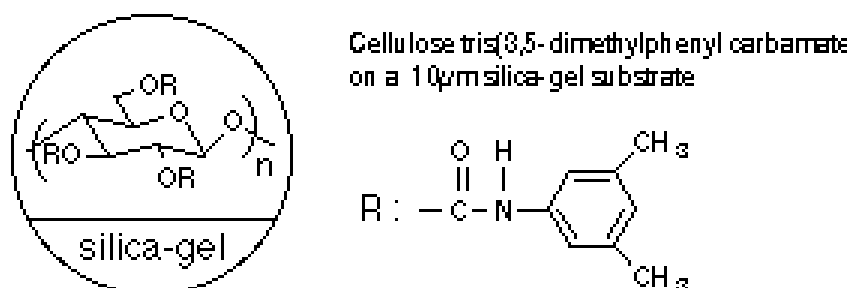


Abb. 16: Matrix der Chiralcel OD Säule (aus der Betriebsanweisung der Chiralcel OD Säule).

Zum Probenvergleich wurde pHPL-Razemat ebenfalls über die chirale Säule aufgetrennt. Um eine Zuordnung der beiden getrennten Razemat-Peaks zu ermöglichen, wurde zusätzlich das L-pHPL-Enantiomer unter den gleichen Bedingungen untersucht.

13 Kristallographische Methoden

13.1 Aufbereiten der Proteinlösung

Das mittels 2'5'-ADP-Sepharose aufgereinigte Protein (11.4) wurde unter Verwendung von Ultrafree 15 Zentrifugaleinheiten und dem Dialysekit ZelluTrans Roth[®] aufkonzentriert und umgepuffert. Dabei bildete die Proteinlösung einen mikrokristallinen Niederschlag aus und musste unter Zugabe von Ammoniumsulfat wieder rückgelöst werden. Die so erhaltene Lösung wurde im Dialyseschlauch gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,0 für 20 Stunden unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert und im gleichen Schlauch gegen PEG 6000 eingengt. Die anschließende Proteinbestimmung nach Bradford (5.2) ergab eine Proteinkonzentration von 6-7 mg/ml.

Für den Kristallisationsansatz der Komplex-Struktur wurde neues Protein aufgereinigt. In diesem Fall wurde das Ni-NTA Batchverfahren verwendet (11.3.2). Die auf 0,1 M

Phosphatpuffer pH 7,0 umgepufferte Lösung fiel bereits mikrokristallin aus, so dass auf eine weitere Aufreinigung mittels 2'5'-ADP-Sepharose verzichtet wurde. Die Mikrokristalle wurden mit Ammoniumsulfat aufgelöst und wie oben aufgeführt weiter behandelt. Bei dieser Lösung wurde eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg/ml bestimmt.

13.2 Kristallisation

Die Kristallisation stellt bei der Strukturaufklärung von Proteinen eine erste Hürde dar. Der Kristallisationsprozess ist prinzipiell bei kleinen Molekülen der gleiche wie bei Makromolekülen (z.B. Proteinen, DNA oder RNA). Bei dem Kristallisationsvorgang erreicht eine metastabile übersättigte Lösung einen Zustand geringerer freier Energie, indem sie die Konzentration an gelösten Molekülen verringert. Dabei liegen drei Stufen der Kristallisation vor: Kristallkeimbildung, Kristallwachstum und Einstellen des Wachstums. Um diesen erwähnten metastabilen übersättigten Zustand der Lösung langsam zu erreichen, bedient man sich im Kristalllabor sehr häufig der Dampfdiffusionsmethode. Hierbei wird durch Verdampfung und Diffusion von Wassermolekülen hin zu höheren Konzentrationen die Proteinlösung langsam eingeengt.

Zunächst liegt das zu kristallisierende Protein in ungesättigter Lösung vor (Abbildung 17 Nr. 1). Durch langsames Eindampfen der umgebenden Lösung durchschreitet die Lösung die metastabile Zone hin zur Nukleationszone. In diesem Bereich herrscht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Kristallkeimbildung. Sind diese einmal entstanden, kann der Kristall unter Verringerung der Proteinkonzentration (und evtl. zusätzlich in sehr geringem Maße der Präzipitatkonzentration) heranwachsen, bis er schließlich das Wachstum einstellt (Abbildung 17 Nr. 2).

Die auch in dieser Arbeit verwendete Dampfdiffusionsmethode kann als Methode des hängenden oder sitzenden Tropfens (hanging oder sitting drop) ausgeführt werden (Abbildung 18). Beiden Verfahren sind gemein, dass ein großes Volumen an Reservoirlösung vorliegt. Die Proteinlösung wird in einem kleinen Tropfen meist 1:1 mit Reservoirlösung vermischt und die Kammer anschließend verschlossen. Durch die Vermischung von Proteinlösung mit Reservoirlösung ist der Proteintropfen nun etwa halb so konzentriert an Komponenten der Reservoirlösung wie die Reservoirlösung selbst. Dieser Konzentrationsunterschied ist die treibende Kraft, die das Wasser aus dem Tropfen hin zur Reservoirlösung verdampfen lässt, bis die Konzentrationen angeglichen sind. Dadurch, dass das Volumen der Reservoirlösung

wesentlich größer ist als der Tropfen (500 μl zu 2-4 μl), ist die Verdünnung der Reservoirlösung zu vernachlässigen.

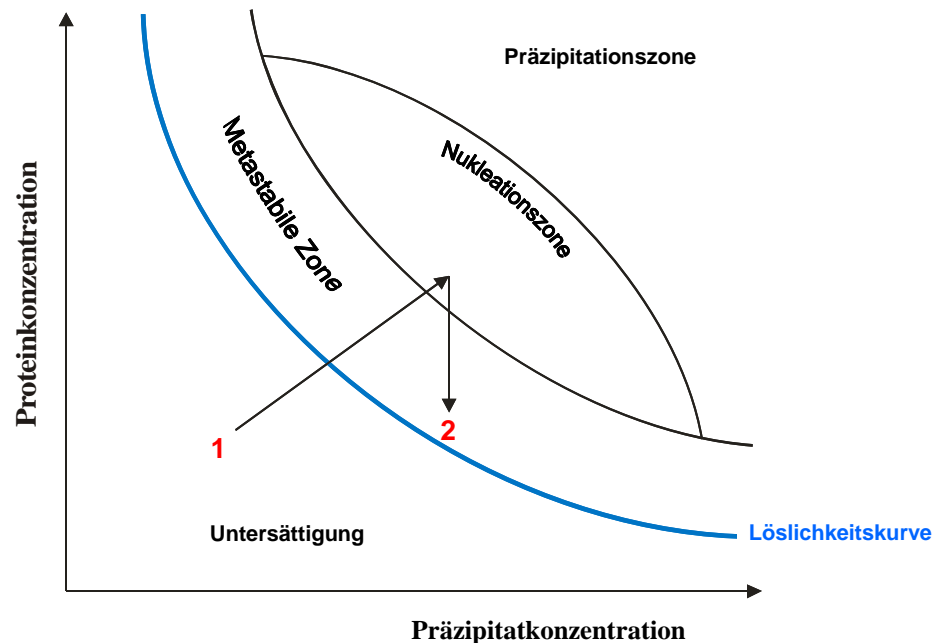


Abb. 17: Prinzipien der Kristallbildung.

Als Präzipitate werden sechs Gruppen unterschieden: Salze, hochmolekulare lineare Polymere (z.B. PEG), MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol), organische Lösungsmittel, sulfonische Farbstoffe und entionisiertes Wasser (McPerson 1990, Arakawa und Timasheff 1985).

Die Kristallisationstemperatur liegt meist bei 4°C oder Raumtemperatur. Dabei liegt der Vorteil der Kristallisation bei 4°C, dass das Protein geschützt und bakterieller Befall verhindert wird. Auch ist der Dampfdruck des Wassers kleiner und somit die Einengung des Tropfens langsamer. Dennoch wird oft bei Raumtemperatur kristallisiert, da viele Proteine auch bei Raumtemperatur genügend stabil sind und Kristalle oft schneller entstehen.

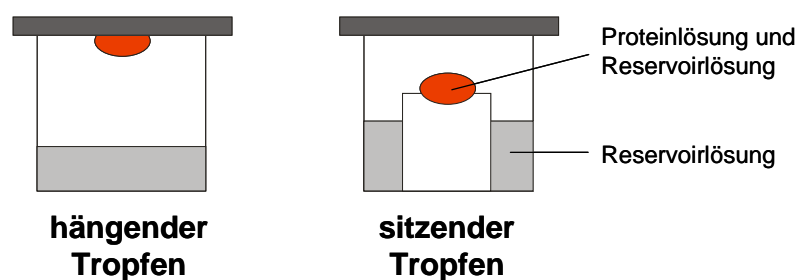


Abb. 18: Methode des hängenden und sitzenden Tropfens.

13.2.1 Kristallisation des H(P)PR-Proteins

Die H(P)PR-Proteinlösung wurde unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen angesetzt, wobei meist das sitting-drop Verfahren verwendet wurde. Als Präzipitatlösungen wurden die Wizard 1 und 2 Kits von Emerald Biostructures verwendet, um eine breite Auswahl an Kristallisationsbedingungen zu testen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 4°C gelagert. Bei verschiedenen Ansätzen bildeten sich unterschiedliche Kristallformen. Die Bedingungen dieser Ansätze wurden weiter verfeinert. Zusätzlich wurde das Additive und Detergent Kit 1 von Hampton Research getestet.

Unter der Bedingung 30% MPD, 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 wuchs ein dreidimensionaler zusammengesetzter Kristallcluster heran, der in einzelne Fragmente zerlegt werden konnte. Fragmente dieses Clusters wurden für die Strukturanalyse verwendet. Da in der Kristallisationslösung genügend MPD enthalten war, wurde kein weiterer Kryoschutz benötigt.

13.2.2 Kristallisation von H(P)PR mit NADP⁺

Das gereinigte Protein (15 mg/ml) wurde mit einer Kristallisationslösung, bestehend aus 20% PEG 1000, 0,1 M Imidazol-Puffer pH 7,5, 0,2 mM DTT und 4 mM pHPP angesetzt. Dabei wurde das Protein zunächst mit 2 mM NADP⁺ versetzt und nach 10minütigem Zentrifugieren im Verhältnis 1:1 mit Kristallisationslösung vermischt. Tetragonal bipyramidale Kristalle wuchsen nach wenigen Tagen bei 26°C im sitting-drop Verfahren.

Für die Röntgenstrukturanalyse wurde 20% Glycerol als Kryoschutz verwendet, der die Bildung von Eiskristallen im Loop bei ca. -170°C (100 K) verhindert.

13.3 Datensammlung und Auswertung

Der native Proteinkristall (13.2.1) wurde bei etwa -170°C (100 K) und einer Wellenlänge von 0,91838 Å am Synchrotron BessyII in Berlin an der Beamline PSF1 vermessen. Es wurden insgesamt 300 Beugungsbilder mit einer jeweiligen Messzeit von 5 Sekunden gesammelt. Als Detektor stand ein MAR CCD zur Verfügung, der mit einem Abstand von 100 mm zum Kristall eingestellt wurde.

Für die Komplexstruktur (vgl. 13.2.2) wurde die Datensammlung an einer RIGAKU Drehanode mit Kupfer als Anodenmaterial und einer Wellenlänge von 1,5418 Å vorgenommen. Die Spannung der Röntgenröhre lag bei 50 kV mit 90 mA. Zur Detektion

wurde ein Raxis IV Flächendetektorsystem (image plate) mit zwei Bildplatten verwendet. Insgesamt wurden 400 Beugungsbilder bei etwa -170°C (100 K) und einem Abstand zwischen Kristall und Detektor von 210 mm aufgenommen. Der Kristall wurde dem Röntgenstrahl für jeweils 12 min mit einer Rotation von $\Delta\varphi = 0,5^\circ$ ausgesetzt.

Die Prozessierung und Skalierung der Datensätze erfolgte mit den Programmen DENZO und SCALEPACK, die im HKL2000 Paket enthalten sind. Die Auflösung beträgt 1,47 Å für die native Proteinstruktur und 2,2 Å für die Komplexstruktur.

13.4 Strukturlösung und Verfeinerung

Mit den Kristall-Daten des nativen Proteins wurde durch molekularen Ersatz versucht, die H(P)PR-Struktur zu lösen. Hierzu wurden die Programme AMoRe (Navaza, 1994), Molrep (Vagin und Teplyakov, 1997) und Beast (Read, 2001) zu Hilfe genommen.

Beim molekularen Ersatz werden die Phasen einer bereits bekannten Modell-Struktur dazu verwendet, erste Elektronendichten einer unbekannten Struktur zu berechnen. Durch Rotations- und Translationsbewegungen des Suchmodells werden zunächst die beiden Datensätze miteinander korreliert. Dabei haben unterschiedliche Programme verschiedene Vorgehensweisen und können zu unterschiedlichen Resultaten führen.

Als Suchmodelle wurden verschiedene verwandte Strukturen aus der PDB verwendet (D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus *L. casei* (1dxy), D-Glycerat Dehydrogenase (1gdh), D-LDH aus *L. helveticus* (2dld), Phosphoglycerat Dehydrogenase aus *E. coli* (1psd)), doch leider führte dies zu keiner eindeutigen Lösung. Auch eine Aufspaltung in zwei Domänen erbrachte keine eindeutigen Resultate für die Rotations- und Translations-Funktion.

Schließlich wurde ein Modell mit dem SWISS-MODELL Server (Schwede et al., 2003), bestehend aus den D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen 1gdh (D-Glycerat Dehydrogenase aus *Hyphomicrobium methylovorum*), 1psd (D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase aus *Escherichia coli*) und 2nad (Format Dehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101) erstellt. Dieses Modell erbrachte mit dem Programm Phaser (McCoy et al., 2005) eine mögliche Lösung mit einem log likelihood gain von 28,3.

Nach einer Berechnung der entsprechenden Elektronendichte konnte diese in dem Programm O (Jones et al., 1991) betrachtet werden. In der Region der Cosubstrat-Bindedomäne war eine zusammenhängende Dichte sichtbar, wohingegen die restliche Dichte sehr ungenau war. Aus 95, in der Elektronendichte gut sichtbaren Aminosäuren, wurde anschließend ein

Ausgangsmodell für die Phasenerweiterung (phase extension) und Optimierung des Modells mit dem Programm Arp/wArp (Lamzin und Wilson, 1993) benutzt.

Nach mehreren Verfeinerungsschritten konnte ein Model mit 298 Aminosäuren, aufgeteilt in fünf Ketten, mit einem Konnektivitätsindex von 0,97 erstellt werden. Die weitere Verfeinerung wurde zunächst mit CNS (Brunger et al., 1998) und später mit dem Programm SHELXL (Sheldrick und Schneider, 1997) durchgeführt. Zum Betrachten und Bauen der Struktur wurde das Programm O verwendet (Jones et al. 1991). Im letzten Verfeinerungszyklus wurden Wasserstoffatome hinzugefügt. Um während der Verfeinerung die Qualität der Struktur zu kontrollieren, wurden 5% der Daten für eine R_{free} -Berechnung benutzt.

Bei der Komplexstruktur wurde die vorher erstellte Proteinstruktur in die beiden Domänen aufgeteilt und diese als Modelle für den Molekularen Ersatz verwendet. Dies wurde mit dem Programm Phaser (McCoy et al., 2005) durchgeführt und erbrachte eine Lösung mit einem log likelihood gain von 1136,2 für die Cosubstrat-Bindedomäne und 247,12 für die Substrat-Bindedomäne.

In der ersten berechneten Dichte konnte der Cofactor deutlich ausgemacht werden. Dieser wurde anschließend in SYBYL (SYBYL Molecular Modeling Software, 7,0 ed.; Tripos Inc., St. Louis, MO, 2004) erstellt und für die folgenden Verfeinerungsschritte eingefügt.

13.5 Docking

Für das Docking der Substratmoleküle wurden die Koordinaten der Komplexstruktur verwendet. Nach Entfernen der Wassermoleküle wurden dem Protein mit Hilfe des Programms PROTONATE, einem Programm aus dem AMBER Paket (Case et al., 2006), polare Wasserstoffatome hinzugefügt. Weiterhin wurden Solvatationsparameter mit add_chrgsol, einer abgewandelten Version des AutoDock Programms ADDSOL, und partielle Atomladungen des AMBER Kraftfeldes ergänzt.

Das Cosubstrat und die Substrate, die in das Protein gedockt werden sollten, wurden im Programm SYBYL erstellt und mit partiellen Atomladungen (Gasteiger Ladungen) versehen. Drehbare Torsionswinkel wurden mit dem Programm AutoTors festgelegt.

Das Programm AutoDock verwendet Gitter, die um das aktive Zentrum definiert werden können. An jedem Gitterpunkt werden Energien für die jeweiligen Atomtypen und die Elektrostatik berechnet. Werden Moleküle in dieses Gitter gedockt, so wird eine Gesamtenergie durch Ablesen dieser Gitterenergien erstellt.

AutoDock setzt zunächst eine Gruppe von Molekülen zufällig in das Gitter und bestimmt nach einer Optimierung von Position, Orientierung und Konformation deren Energien. Diese optimierten Werte werden an die nächste Generation an Molekülen weitergegeben. Dabei werden die Werte von Molekülen mit niedrigen Energien stärker übernommen als von Molekülen mit hohen Energien. Diese evolutionäre Anpassung von Grundwerten (Genen) bezeichnet man auch als einen Lamarck'schen genetischen Algorithmus (LGA) (Morris et al., 1998). Nach einer definierten Mutations- und crossover-Rate von Genen erfolgt der nächste Optimierungszyklus. Der Lauf endet, sobald eine vorgegebene Anzahl an Generationen optimiert wurde, die Gesamtenergie der Population nicht mehr besser wird oder eine bestimmte Anzahl an Energie-Bewertungen durchgeführt wurde. Das Molekül mit der niedrigsten Gesamtenergie wird als Docking-Lösung für den jeweiligen Lauf gespeichert.

Für das Docking der Substrate in die H(P)PR-Komplexstruktur wurde ein Gitter um den katalytischen Spalt von 20 Å x 22 Å x 24 Å mit einem Abstand von 0,5 Å erstellt.

Die Standardbedingungen beinhalteten eine Anfangspopulation von 50 willkürlich platzierten Substratmolekülen, einer maximalen Anzahl von 3×10^6 Energiebewertungen, einer Mutationsrate von 0,02, einer crossover-Rate von 0,80 und einem Elitismuswert von 1,0.

Es wurden 100 unabhängige Docking Läufe für jedes Substrat ausgeführt und anschließend nach der Gesamtenergie durch die Bewertungsfunktion (scoring funktion) von AutoDock sortiert. Ergebnisse, die in ihren RMSD (Root Mean Squared Deviation) mit weniger als 1 Å abwichen, wurden zusammengefasst.

13.6 Protein Daten Bank Deponierungscode

Die Koordinaten der nativen Proteinstruktur und die der Komplexstruktur wurden bei der PDB mit den Codes 3ba1 und 3baz eingestellt.

III Ergebnisse

14 H(P)PR und ähnliche Sequenzen

14.1 H(P)PR im pET-15b Vektor

Da zu Beginn der Arbeit die DNA-Sequenz der H(P)PR bereits bekannt war, wurden entsprechende Primer verwendet, die an den beiden Enden der Sequenz binden konnten. Durch die Primer wurde am N-Terminus eine *NdeI* Schnittstelle und am C-Terminus eine *BamHI* Schnittstelle eingeführt, durch die es möglich wurde, die H(P)PR-DNA später in den Vektor pET-15b einzuklonieren.

Die PCR brachte, wie zu erwarten war, eine starke Bande zwischen 900 und 1000 bp (vgl. Abbildung 19), die zunächst in den Vektor pGem[®]T einligiert und in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert werden konnte.

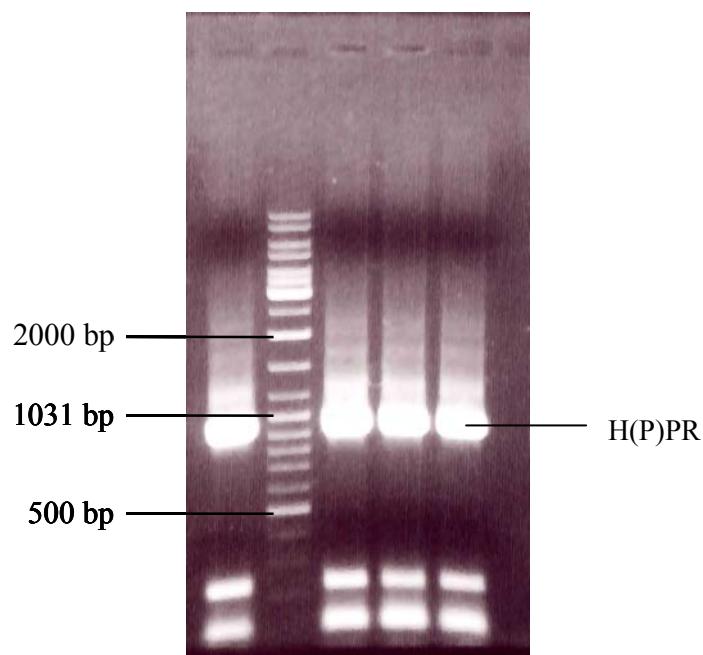


Abb. 19: Agarosegel mit aufgetragener H(P)PR-PCR (Bahn 1 + 3-5: H(P)PR-PCR; Bahn 2: DNA Marker).

Um das Protein später exprimieren und über Ni-NTA Affinitätschromatographie reinigen zu können, wurde die H(P)PR-cDNA aus dem Vektor pGem[®]T mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* herausgeschnitten und in den Vektor pET-15b einligiert. Dieses Konstrukt wurde zunächst ebenfalls in den *E. coli* Stamm JM109 und anschließend in den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS eingebracht.

Die Sequenzierung des Plasmides eines erfolgreich transformierten Klons bestätigte die H(P)PR-Sequenz. Sie besteht aus 939 Basenpaaren, die für 313 Aminosäuren kodieren:

```

atggaggcgattggcgttttgatgatgtgcccgatgagcacctacttggagcaagagctt 60
M E A I G V L M M C P M S T Y L E Q E L
gacaagcgggttaagctctttcgttactggactcagccggcgagcgcgacttcctcgct 120
D K R F K L F R Y W T Q P A Q R D F L A
ctgcaggccgagtcctatccgcgcggtgggttgggaattcgaacgccggtgccgatgctgag 180
L Q A E S I R A V V G N S N A G A D A E
ttgatcgacgcactgccgaaactggagattgtgtcgcagcttttagcgtgggtctggataag 240
L I D A L P K L E I V S S F S V G L D K
gttgacttgatcaagtgtgaggagaagggggttagggttaccaacacgcccgatgtgctg 300
V D L I K C E E K G V R V T N T P D V L
acgggatgacgtcgcggtttggcgatcggttgatgtttggcggttttgaggcggatttgt 360
T D D V A D L A I G L I L A V L R R I C
gagtgtgataagtatgtgaggagagggcggtggaaatttggagacttcaagttgacgact 420
E C D K Y V R R G A W K F G D F K L T T
aagttcagcggtaaaagagttggcatcataggattgggcagaatcgggttagcagttgct 480
K F S G K R V G I I G L G R I G L A V A
gagcgagcagaggcatttgattgtccaatcagttacttttcaagatccaagaaacccaac 540
E R A E A F D C P I S Y F S R S K K P N
acaaactacacatactatggcagcgttgtagaattggcgtcaaacagtgacatcctagtc 600
T N Y T Y Y G S V V E L A S N S D I L V
gtagcatgtccctgactccagaaacaactcatattatcaatcgagaagtaatcgatgct 660
V A C P L T P E T T H I I N R E V I D A
ctgggtccaaaggagttctcatcaacattggaaggggacctcatgttgatgagcccgaa 720
L G P K G V L I N I G R G P H V D E P E
ctgggtgtctgtcttgtggagggcgctctgggtggcgctggtcttgatgtattcgaaagg 780
L V S A L V E G R L G G A G L D V F E R
gaaccagaggtaccggagaagctcttcgggtctggaaaatgttgctcctgttgccacatgta 840
E P E V P E K L F G L E N V V L L P H V
gggagtgccacgctggaaacgcgtaaaagtgatggctgatcttgcgtcggaacttgga 900
G S G T V E T R K V M A D L V V G N L E
gctcacttctccggcaagcctctcttaactccagtagtttgatag 945
A H F S G K P L L T P V V - -

```

Abb. 20: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der H(P)PR.

14.1.1 Sequenzvergleich der H(P)PR

Bei einer EMBL-Datenbanksuche nach ähnlichen Nukleotidsequenzen mit Hilfe des Programms FASTA3 (Pearson und Lipman, 1988; Pearson, 1990) ergaben sich folgende Homologien zu anderen cDNAs. Aufgeführt sind die vier ähnlichsten cDNA-Sequenzen (Stand Dezember 2006):

87,71% Identität; cDNA aus *Salvia miltiorrhiza* (EM_PL: DQ099741)

313 AS, 34210 Da, putative Hydroxyphenylpyruvat Reduktase

72,93% Identität; cDNA aus *Lycopersicon esculentum* (EM_PL: BT013950)

mRNA Klon

69,87% Identität; cDNA von *Lotus corniculatus* var. *japo* (EM_PL: AP006863)

genomische DNA, Chromosom 2, 61379-62323

68,15% Identität; cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (EM_PL: AY069901)

313 AS, 34161 Da, putative D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure DH

Leider wurden von den homologen Proteinen bislang keine biologischen Funktionen nachgewiesen, da die meisten Sequenzen aus Genomprojekten stammen. Daher sollte die Sequenz aus *Arabidopsis* ebenfalls kloniert werden, um das Protein genauer untersuchen zu können. Die Charakterisierung des Proteins sollte andersweitig im Rahmen einer Diplomarbeit erfolgen.

14.2 Klonierung einer H(P)PR-ähnlichen cDNA aus *Arabidopsis thaliana*

Nach der Sequenz des H(P)PR-ähnlichen Enzyms aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. EMBL Q9CA90) wurden Primer entwickelt, die es ermöglichen sollten, die cDNA ebenfalls in den pET-15b-Vektor einzubringen. Wegen einer internen Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI und wegen fehlender Ausweichschnittstellen in der Multiple Cloning Site des pET-15b-Vektors, wurden die Primer so entwickelt, dass sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende eine *Nde*I Schnittstelle eingeführt wurde. Nach der PCR wie unter 9.2 beschrieben, konnte die ca. 1000 bp Bande ausgeschnitten, aufgereinigt und direkt in den mit *Nde*I verdauten und dephosphorylierten pET-15b Vektor ligiert werden.

Aufgrund der schlechten Transformierbarkeit des Expressionsstammes BL21(DE3)pLysS, wurde, wie bereits bei der H(P)PR, zunächst in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert und danach das Konstrukt in den Expressionsstamm eingebracht.

Eine Sequenzierung des Plasmids ergab die der Datenbanksuche entsprechende Sequenz.

14.3 Klonierung zwei neuer H(P)PR-ähnlicher cDNAs aus Aubergine und Paprika

Um einen weiteren Überblick über das Vorkommen H(P)PR-ähnlicher Proteine im Pflanzenreich zu gewinnen, wurde mit Hilfe von degenerierten Primern versucht, weitere homologe Gene aus anderen Pflanzen zu isolieren. Dabei wurden auf konservierte Regionen H(P)PR-ähnlicher Sequenzen gerichtete degenerierte Primer entwickelt, die allerdings in PCR-Amplifikationen zu keinem Erfolg führten.

Schließlich wurde die bereits bekannte Sequenz aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate) verwendet, um Primer zu entwickeln, mit deren Hilfe zwei neue Sequenzen aus den beiden Solanaceen Paprika (*Capsicum annuum*) und Aubergine (*Solanum melongena*) gefunden werden konnten. Die mittels PCR vervielfältigten DNA-Stücke wurden direkt in den pET-15b-Vektor ligiert. Das Konstrukt wurde in den Bakterienstamm JM109 eingebracht. Eine Sequenzierung der Plasmide ergab die unten angegebenen cDNA-Sequenzen.

Aubergine	ATGGAAGCATCGGAGTATTGATGGCCTGTCCAATGTCATCTTACCTAGAGCAAGAGCTT	60
Paprika	ATGGAAGCATCGGAGTATTGATGGCGTGTCCAATGTCATCCTACTTAGAGCGAGAACTA	60

Aubergine	GACAAGCGATTCAAGCTCTTCCGATTCTGGAAGTACTCCAGAAAGCAATTCCTCAAT	120
Paprika	GACAAGCGATTCAAGCTCTTCCGCTTCTGGAAGTCTCCGAGAGTCTGAATTCCTGAAT	120

Aubergine	CAGCACGCTAATTCCATCCGTGCTGTGTCGGCAACGCCTTCGCCGGTGCTGACGCGGAG	180
Paprika	GAGCACGCTGATTCCATCCGTGCTGTTGTGCGCAATGCCTTCGCCGGCGCTGACGCTGAG	180

Aubergine	CTCATCGATGCCCTCCCTAAACTCGAGATCGTTTCGAGTTTCAGTGTTGGTTTAGATAAG	240
Paprika	TTAATCGATTCCCTTCCGAAGCTCGAGATTGTTTCGAGTTTCAGTGTTGGTTTAGATAAG	240
	* *****	
Aubergine	ATTGATTTGAACAAATGTAAAGAGAAGGGGATTAGGGTTACTAATACCCCGATGTTTTG	300
Paprika	ATTGATTTGAATAAGTGTAAAGAGAAGGGGATTAGGGTTACGAATACTCCTGATGTTTTG	300

Aubergine	ACTGAGGATGTGGCTGACTTGGCCATAGGGTTGATGTTGGCCGTCCTTAGAAGGATTTGC	360
Paprika	ACTGAGGATGTCGCTGATTGCTATTGGATTGATGCTGGCTGTACTTAGGAGGATTTGT	360

Aubergine	GAATGCGATCGGTATGTTAGGAAAGGGTGTGGAAGACC---GGTGATTTCAAGTTGACT	417
Paprika	GAGTGTGATCGCTATGTTAGGAAAGGGCTGTGGAAGACCTCCGGTGATTTCAAATTGACT	420
	** * *****	
Aubergine	TCTAAGTTTAGTGCCAAATCAGTGGGTATCATAGGATTGGGAAGGATTGGCTTAGCAATT	477
Paprika	TCTAAGTTTAGTGCCAAATCAGTGGGTATCATAGGATTGGGAAGGATTGGCTTAGCAATT	480

Aubergine	GCTAAGAGAGCGGAAGCTTTTGACTGTCCAATCAGTTACTACACGAGATCAGAAAAGCCA	537
Paprika	GCTAAGAGAGCAGAAGCTTTTGACTGTCCAATCAGTTACTACACGAGATCAGAAAAGCCA	540

Aubergine	AATACAAATTATAAGTATTATCCGAGTGTAGTTGAATTGGCTTCCAATTGCCAGATTCTG	597
Paprika	AATACAAATTATAAGTACTATCCAAGTGTGCTGAGTTGGCTTCCAATTGCCAGATTCTG	600

Aubergine	GTTGTGGCATGTGCACTGACTCCTGAGACTCGTCATATTGTCAACCGTGAAGTCATGGAA	657
Paprika	GTTGTGGCATGTCCACTGACTCCTGAAATCATCATATTGTCAATCGTGAAGTCATGGAA	660

Aubergine	GCTTTGGGATCAAAGGGGATTCTGATTAACATTGGCCGTGGTCTCATGTTGATGAAAAG	717
Paprika	GCTTTGGGACCAAAGGGGTCTGATTAACATTGGTAGGGGTCTCATGTTGATGAAAAG	720

Aubergine	GAGCTTGTATCTGCTCTTGTGGAAGGCCGATTAGGGGGTGCTGGCCTTGATGTGTTTGAG	777
Paprika	GAGCTTGTATCTGCTCTTCTTGAAGGCCGATTAGGGGGTGCTGGCCTTGATGTGTTTGAG	780

Aubergine	AATGAACCTGAAGTACCAGAGCAGCTCTTTGGCCTTGAGAATGTAGTCCTATTGCCTCAT	837
Paprika	AATGAGCCTGGAGTACCAGAGCAGCTCTTTGGCCTTGAGAATGTGGTCCTATTGCCTCAT	840

```

Aubergine      GTAGGCAGTGGCACAGAGGAAACACGCAAGGCCATGGCCGACCTTGTCTTGGGAACTTA 897
Paprika      GTAGGTAGTGGCACAAAGGAAACACGCAAGGCCATGGCTGACCTTGTCTTGGGAACTTA 900
                *****
Aubergine      GAAGCTCACTTTCTGAACAAACCGCTGTTAACTCCAGTGGTTTAATAGG 946
Paprika      GAAGCTCACTTTCTGAAGAAACCGCTGTTAACTCCAGTGGTTTAATAGG 949
                *****

```

Abb. 21: Nukleotidsequenzen von H(P)PR-ähnlichen cDNAs aus Aubergine und Paprika. Die Primer-Regionen sind kursiv dargestellt.

Das Umschreiben in die codierten Aminosäuren verdeutlicht die sehr hohe Ähnlichkeit zu dem bereits bekannten Protein aus Tomate, aber auch zur der H(P)PR-Sequenz aus *Coleus blumei* (Abbildung 22). Vergleicht man die AS-Sequenzen mit dem H(P)PR-Protein, so ergeben sich 83,4% Identität für das Protein aus Aubergine, 83,1% für das Protein aus Paprika und 82,1% für das Tomaten-Protein. Während die Proteine aus Aubergine und Tomate ebenfalls aus 313 AS aufgebaut sind, enthält das Paprika-Protein eine zusätzliche Aminosäure.

```

Aubergine      MESIGVLMACPMSSYLEQELDKRFKLFRTWNYSQKNEFLNQHANSIRAVVGNAFAGADAE 60
Tomate        MESIGVLMACPMSSYLEQELDKRFKLFRTWNVPQKNEFLSQHADSIRAVVGNAFAGADAE 60
Paprika      MESIGVLMACPMSSYLERELDKRFKLFRTWNFPQKSEFLNEHADSIRAVVGNAFAGADAE 60
H(P)PR Coleus MEAIGVLMMPMSTYLEQELDKRFKLFRTWTQPAQRDFLALQAESIRAVVGNSNAGADAE 60
                **:***** :*:***:*****:*. . : :*: :*:*****: *****
Aubergine      LIDALPKLEIVSSFSVGLDKIDLNKCKEKGIRVTNTPDVLTEDEVADLAIGLMLAVLRRIC 120
Tomate        LINSLPKLEIVSSFSVGLDKIDLNKCKEKGIRVTNTPDVLTEDEVADLAIGLMLAVLRRIC 120
Paprika      LIDSLPKLEIVSSFSVGLDKIDLNKCKEKGIRVTNTPDVLTEDEVADLAIGLMLAVLRRIC 120
H(P)PR Coleus LIDALPKLEIVSSFSVGLDKVDLIKCEEKGVRTNTPDVLTDVADLAIGLILAVLRRIC 120
                **: :*****:*****:*** :*:***:*****:*****:*****:*****
Aubergine      ECDRYVRKGLWKT-GDFKLTSKFSGKSVGIIGLGRIGLAIKRAEAFDCPISYYTRSEKP 179
Tomate        ECDRHVRKGLWKS-GDFKLTSKFSGKSVGIIGLGRIGLAIKRAEAFGCPISYYTRSEKP 179
Paprika      ECDRYVRKGLWKTSGDFKLTSKFSGKSVGIIGLGRIGLAIKRAEAFDCPISYYTRSEKP 180
H(P)PR Coleus ECDKYVRRGAWKF-GDFKLTTFKFSGRVGIIGLGRIGLAVAERAFAFDCPISYFSRSKKP 179
                ***:***:* ** :*****:***** :*****:***:*****.*****:***:**
Aubergine      NTNYKYYPVSVVELASNCQILVVACALTPETRHIVNREVMEALGSKGILINIGRGPVHDEK 239
Tomate        NTNYKYYPVSVVELASNCQILVVACALTPETRHIVNREVMEALGSKGILINIGRGPVHDEK 239
Paprika      NTNYKYYPVSAELASNCQILVVACPLTPETHHIVNREVMEALGPKGVLINIGRGPVHDEK 240
H(P)PR Coleus NTNYTYGVSVELASNSDILVVACPLTPETTHIINREVIDALGPKGVLINIGRGPVHDEP 239
                ****. ** *.*****.:*****.***** **:*****:***. **:*****:*****
Aubergine      ELVSALVEGRLGGAGLDVFENEPEVPEQLFGLENVVLLPHVGSGETETRKAMADLVLGNL 299
Tomate        ELVSALLEGRLGGAGLDVFENEPEVPEQLFGLENVVLLPHVGSGETETRKAMADLVLGNL 299
Paprika      ELVSALLEGRLGGAGLDVFENEPEVPEQLFGLENVVLLPHVGSGETETRKAMADLVLGNL 300
H(P)PR Coleus ELVSALVEGRLGGAGLDVFEREPEVPEKLFGLENVVLLPHVGSGETVETRKVMADLVVGNL 299
                *****:*****. ** **:*****:***** *****.*****:***
Aubergine      EAHFLNKPLLTPVV 313
Tomate        EAHFLNKPLLTPVV 313
Paprika      EAHFLKKPLLTPVV 314
H(P)PR Coleus EAHFSGKPLLTPVV 313
                *****

```

Abb. 22: Vergleich der H(P)PR AS-Sequenz mit ähnlichen AS-Sequenzen aus Solanaceen.

14.4 Vergleich der H(P)PR-Sequenzen aus einer Zellkultur und Pflanzen von *Coleus blumei*

Die Zellkultur von *Coleus blumei*, aus der die H(P)PR-Sequenz gewonnen wurde, besteht seit mindestens 20 Jahren (mündliche Aussage von M. Petersen). Während dieser Zeit hat sich nicht nur das Aussehen der Zellkultur verändert, auch der Gehalt an Rosmarinsäure hat stark abgenommen. Um sicherzustellen, dass das H(P)PR-Gen währenddessen keinen Mutationen unterlag, sollte die Nukleotidsequenz aus der Zellkultur mit zwei Sequenzen aus Pflanzen verglichen werden. Hierzu wurde das H(P)PR-Gen aus zwei *Coleus*-Pflanzen (*Coleus* M, einer Zimmerpflanze und *Coleus* V6, einer sterilen Laborpflanze) kloniert und sequenziert. Dabei zeigten sich im Vergleich mit der Zellkultur-Sequenz kaum Abweichungen. Die Nukleotidsequenz des Proteins aus *Coleus* M besitzt anstelle einer Thymidinbase an Position 28 eine Adeninbase, was auf Aminosäureebene zum Austausch eines Cysteins durch ein Serin führt (Aminosäure 10). Die restliche cDNA entspricht der Nukleotidsequenz aus der Zellkultur. Bei der H(P)PR-cDNA aus *Coleus* V6 wurden nur die ersten 840 Basen hinreichend genau sequenziert. Diese allerdings sind identisch mit der Nukleotidabfolge der Zellkultur-H(P)PR-cDNA.

15 Gewinnung des H(P)PR-Proteins

15.1 Bakterienkultur

Zunächst wurde eine große Menge an Bakterienkultur mit dem H(P)PR/pET-15b transformierten Expressionsbakterium BL21(DE3)pLysS angesetzt. Meist bestand dieser Ansatz aus etwa 4 Litern. Nach Induktion mit 1 mM IPTG (11.1.1) und einer Inkubationszeit von 3-5 Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert und in Puffer mit Ultraschall aufgeschlossen (vergleiche 11.2).

15.2 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Nach Abtrennen der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde das H(P)PR-Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (11.13). Während anfangs das Batchverfahren verwendet wurde, diente später die FPLC-Methode, mit der wesentlich größere Mengen an Protein aufgereinigt werden konnten, als Methode der Wahl.

Dabei wurde wie unter 11.3.1 beschrieben vorgegangen. Abbildung 23 zeigt einen typischen Verlauf der Proteinaufreinigung mit Hilfe der FPLC-Methode. Das auf diese Weise gereinigte Protein wurde für die Enzym-Charakterisierung verwendet.

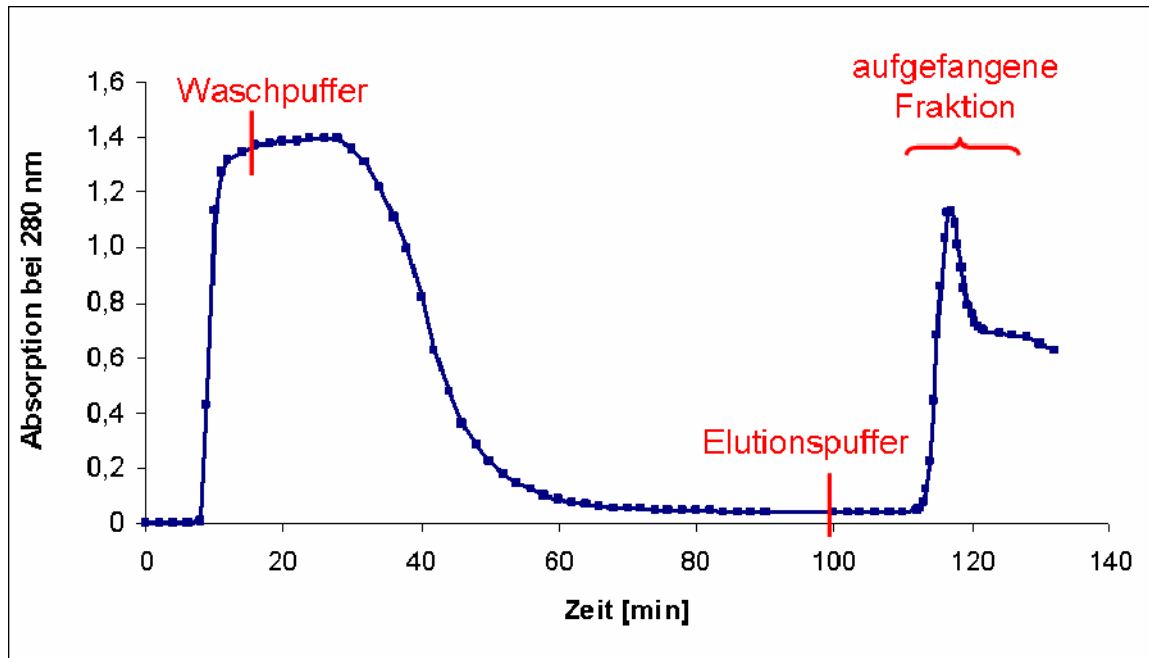


Abb. 23: Verlauf der Ni-NTA Affinitätsreinigung.

15.3 Reinigung über 2'5'-ADP-Sepharose

Während das nach der Ni-NTA Reinigung erhaltene Protein für die Charakterisierung rein genug war, musste das Protein für die Kristallisation meist einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen werden. Hierzu wurde eine 2'5'-ADP-Sepharose 4B FPLC-Säule zu Hilfe genommen (11.4). Dafür musste das Protein zunächst auf den Grundpuffer (Puffer A) umpufferf werden und konnte mit steigendem NaCl-Gehalt von der Säule eluiert werden. Ein typischer Verlauf der FPLC-Reinigung ist in Abbildung 24 wiedergegeben.

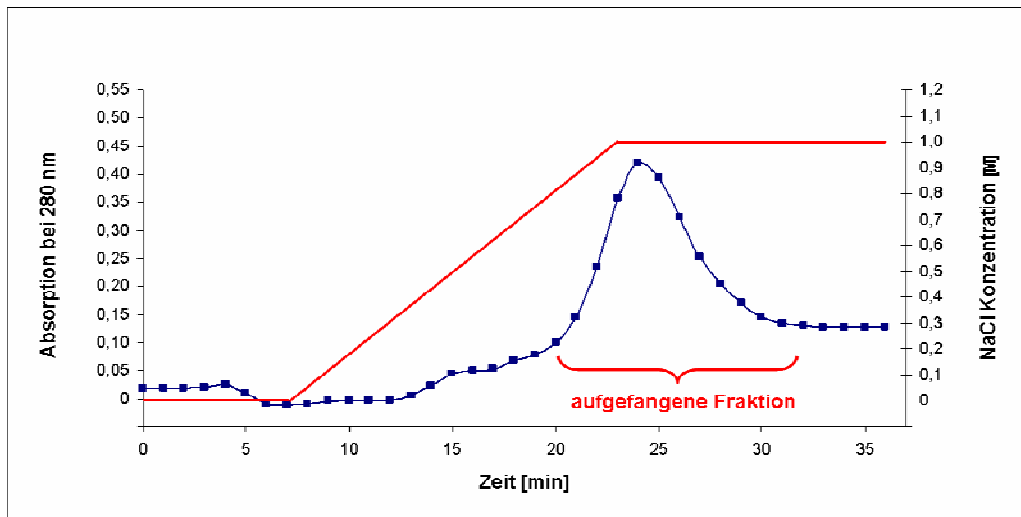


Abb. 24: Verlauf der 2'5'-ADP-Sepharose Reinigung mittels FPLC.

15.4 Überprüfung der Reinheit der Proteinfractionen

Die Reinheit der erhaltenen Proteinfractionen wurde mit einem SDS-Gel überprüft (vergleiche 5.1). Abbildung 25 zeigt ein SDS-Polyacrylamid-Gel mit Fraktionen der einzelnen Protein-Reinigungsschritte. Es wird deutlich, dass das H(P)PR-Protein mit dem angehängten His-Tag, welches im Rohenzymextrakt zu einem hohen Anteil vorhanden ist (Bahn 1), fast vollständig an die Ni-NTA Säule bindet, da im Durchlauf (Bahn 2) kaum H(P)PR-Protein vorkommt. Das gebundene Protein kann nach einigen Waschschritten mit einem konzentrierten Imidazolpuffer von der Säule abgelöst werden (Bahn 3). Im Bereich um 66 kDa erkennt man allerdings noch weitere schwache Proteinbanden. Diese Proteine lassen sich gut mit der anschließenden 2'5'-ADP-Sepharose-Säule abtrennen. Die erhaltene Proteinfraction weist kaum noch Verunreinigungen durch andere Proteine auf (Bahn 4).

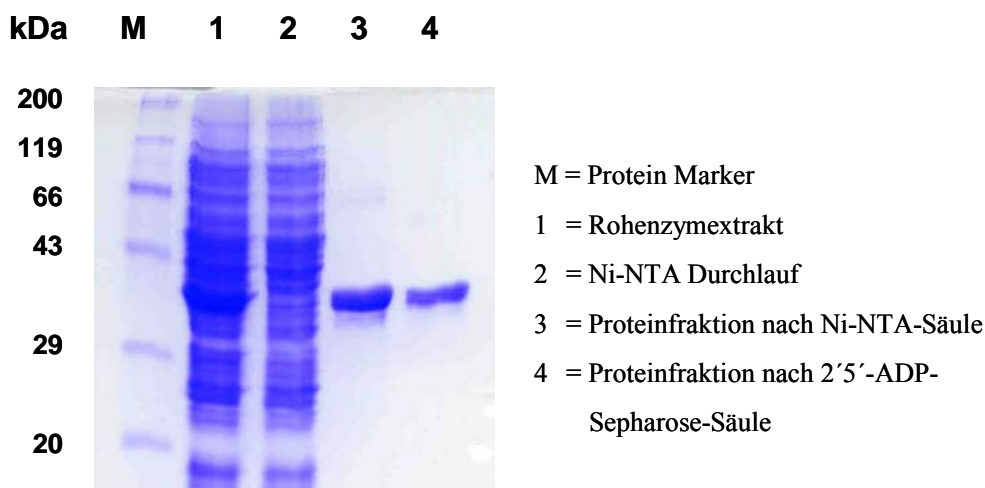


Abb. 25: SDS-Gel mit Fraktionen der Proteinreinigung.

16 Charakterisierung des heterolog exprimierten H(P)PR-Proteins

16.1 pH-Abhängigkeit

16.1.1 pH-Abhängigkeit in unterschiedlichen Puffern

Die pH-Abhängigkeit der H(P)PR wurde durch Nachweis der Reaktionsprodukte durch HPLC bestimmt (vergleiche 12.1). Hierzu wurden jeweils Doppelbestimmungen bei 40°C und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (der pH wurde nach 5 min. im Reaktionsansatz gemessen, da dieser stark temperaturabhängig sein kann). Die Reaktionszeit lag bei 10 min. Zunächst wurden unterschiedliche Puffer verwendet, um den am besten geeigneten Puffer herauszufinden und um einen breiten pH-Bereich abzudecken. Dieser pH-Bereich verschob sich teilweise, je nach verwendetem Puffer, im Reaktionsansatz. Besonders der Tris-Puffer erwies sich als stark temperaturabhängig (der pH-Wert des pH-7,0-Puffers lag im Reaktionsansatz bei 5,72). Weiterhin wurde eine unterschiedlich starke Enzymaktivität in den verschiedenen Puffern beobachtet. Der Kaliumphosphatpuffer erwies sich als gut geeignet, da er zum einen kaum temperaturabhängig war, zum anderen den pH um 7,0 gut abpuffert und schließlich die Aktivität des Enzyms nicht erniedrigte. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 26 wiedergegeben. In den Kurven lässt sich ein pH-Optimum um pH 7,0 ablesen.

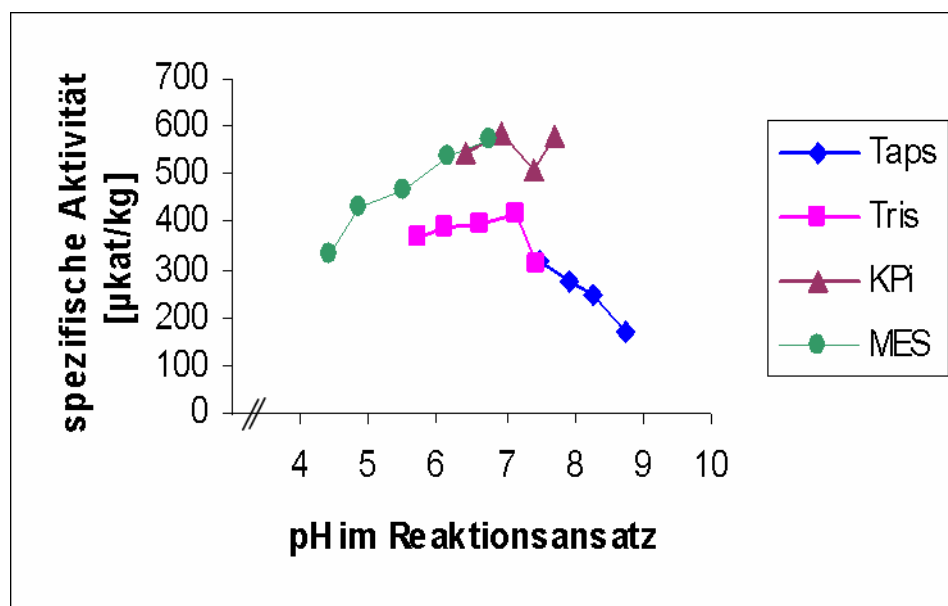


Abb. 26: pH-Abhängigkeit der H(P)PR bei 40°C mit unterschiedlichen Puffern (Taps = N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropansulfonsäure, Tris = Tris/HCl-Puffer, KPi = Kaliumphosphatpuffer, MES= 2-Morpholinoethansulfonsäure).

16.1.2 pH-Abhängigkeit in Britton-Robinson Puffer

Um eine einheitlichere pH-Kurve zu bekommen und damit die Werte vergleichbarer zu machen, wurde ein Puffer gewählt, der einen breiten pH-Bereich abdeckt und nicht so temperaturabhängig ist. Hierzu wurde der Britton-Robinson Puffer verwendet (0,04 M Phosphorsäure, 0,04 M Essigsäure, 0,04 M Borsäure, mit NaOH eingestellt). Dieser reichte von pH 3,4 bis zu einem pH von 9,4. Die Bedingungen entsprachen denen unter 16.1.1. Die resultierende Kurve zeigt ein eindeutiges pH-Optimum bei pH 7,0 (Abbildung 27).

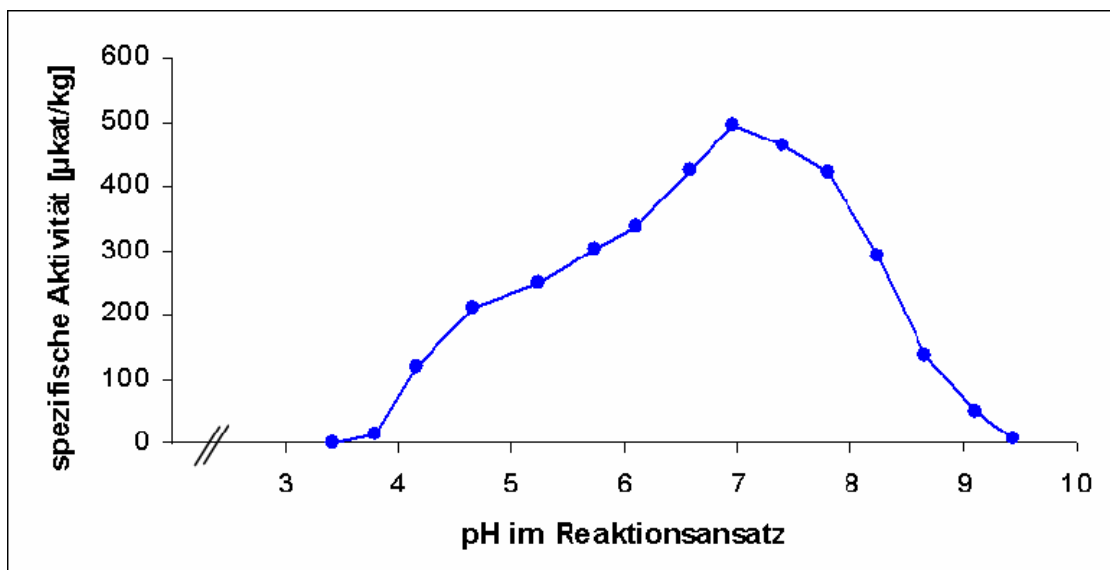


Abb. 27: pH-Abhängigkeit der H(P)PR bei 40°C in Britton-Robinson Puffer.

16.2 Temperaturabhängigkeit

Für die Überprüfung des Temperaturoptimums wurden die Reaktionsansätze bei unterschiedlichen Temperaturen für etwa 7 min. vortemperiert und anschließend für jeweils 10 min. inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch HPLC. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die resultierende Kurve ist in Abbildung 28 wiedergegeben. Es ist ein breites Temperatur-Optimum bei etwa 40 – 55°C zu erkennen. Für anschließende Tests wurde die Temperatur bei 37°C etwas unterhalb des Optimums festgelegt.

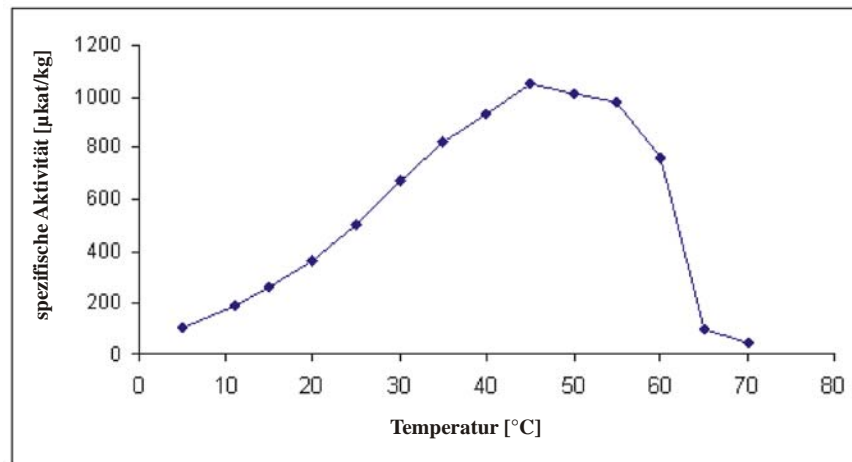


Abb. 28: Temperaturabhängigkeit der H(P)PR.

16.3 Substratspezifitäten und K_m -Werte

Generell standen zur Bestimmung der K_m -Werte zwei Methoden zur Verfügung, die Auswertung über HPLC und die photometrische Messung über den Verbrauch von NAD(P)H. Bei der HPLC-Methode konnte nach einer erfolgten Reaktion das entstandene Produkt direkt quantitativ gemessen werden. Die photometrische Auswertung ließ dagegen nur eine indirekte Bestimmung der Enzymaktivität über die Abnahme des Cosubstrates (NADH oder NADPH) zu. Dafür hatte die letztere Methode den Vorteil, dass eine Linearität der ablaufenden Reaktion überprüft werden konnte. Beide Methoden hatten allerdings nur einen eingeschränkten Einsatzbereich bei der Bestimmung der K_m -Werte, der im Folgenden kurz erläutert werden soll.

Die HPLC-Methode konnte nur für Substrate eingesetzt werden, deren Produkt im UV-Bereich des Detektors absorbierte. Weiterhin musste das Produkt zur Identifizierung und Quantifizierung zur Verfügung stehen. Kleine Umsätze waren schlecht detektierbar und große Substratmengen bereiteten Probleme bei der Vermessung, da kleinere Peaks vom sehr großen Substratpeak kaum abzutrennen waren. Mit der HPLC-Methode wurde nur ein Substrat näher bestimmt, nämlich das 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP).

Bei der Vermessung am Photometer tauchte das Problem auf, dass bei einer Wellenlänge von 340 nm, bei der normalerweise die NADH/NADPH-Detektion durchgeführt wird, die meisten Substrate ebenfalls absorbierten. Dies hätte zum einen dazu geführt, dass die Abnahme des

Cosubstrates und die mögliche Absorptionzunahme durch das Produkt registriert worden wären, was die Ergebnisse verfälscht hätte. Zum anderen war die absolute Absorption der Reaktionsansätze mit den erforderlichen Substrat- und Cosubstrat-Mengen so hoch, dass eine Messung im linearen Bereich des Photometers nicht möglich war. Aus diesen Gründen wurde eine Wellenlänge von 380 nm zur Messung der Enzymaktivitäten gewählt (vergleiche Absorptionsspektren in Abbildung 29). Dies führt zu einer teilweisen Verringerung des systematischen Fehlers. Zur etwaigen Abschätzung des aufgetretenen Fehlers wurden die molaren Extinktionskoeffizienten für die gemessenen Substrate bestimmt, die bei den entsprechenden Abschnitten aufgeführt werden. Weiterhin sei erwähnt, dass durch dieses Vorgehen die Messungen weniger sensitiv wurden.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der am Photometer gemessenen Proben wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{spezifische Aktivität [kat / kg]} = \frac{(\Delta E / \text{min}) \cdot V_{\text{gesamt}}}{\epsilon_{\text{NADPH}} \cdot d \cdot c_{\text{Protein}} \cdot V_{\text{Protein}}}$$

$\Delta E/\text{min}$: Änderung der Extinktion pro Minute, Aktivität [min^{-1}] oder [60 s^{-1}]

V_{gesamt} : Gesamtvolumen der Probe [μl]

ϵ_{NADPH} : molarer Extinktionskoeffizient NADPH bei 380 nm [cm^2/mmol] oder [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

c_{Protein} : Proteinkonzentration [mg/ml]

V_{Protein} : Volumen an eingesetztem Protein [μl]

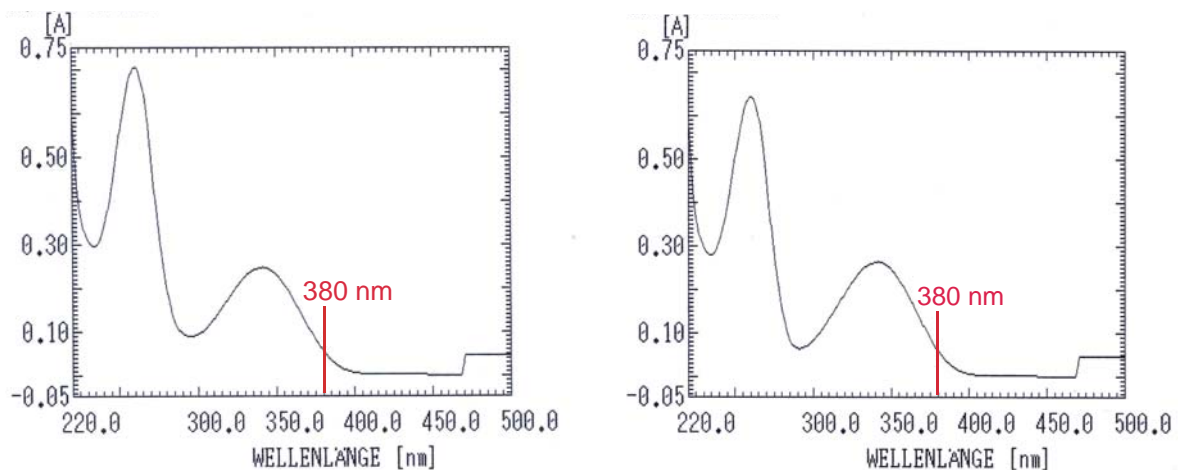


Abb. 29: Absorptionsspektren von NADPH (links) und NADH (rechts).

16.3.1 Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH und NADH

Um die Photometer-Messungen auswerten zu können, musste zunächst der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{380} von den beiden Cosubstraten bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Cosubstrat-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 380 nm vermessen und durch Auftragen der Extinktionen gegen die Konzentration eine Gerade erstellt. Die Steigung der Geraden entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{380} .

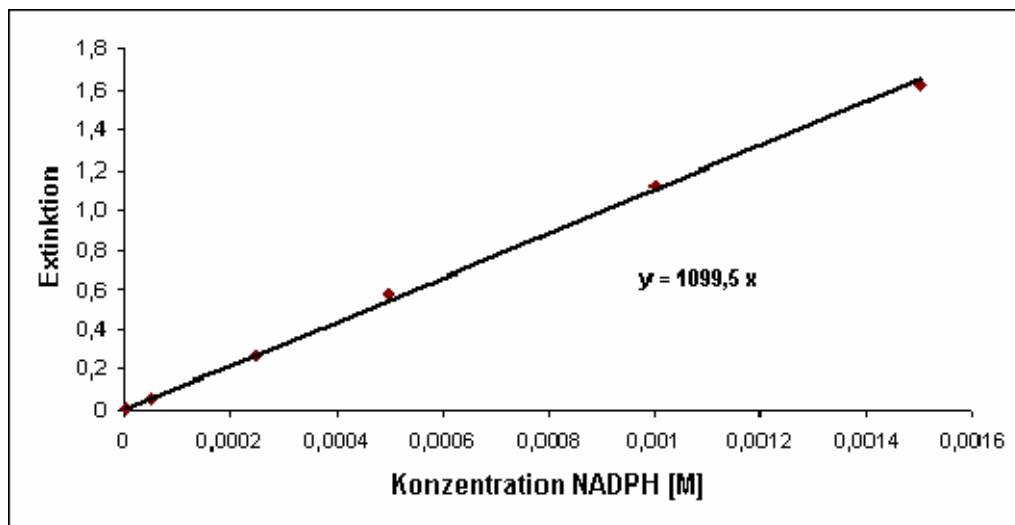


Abb. 30: Molarer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 380 nm.

Anhand der Geradensteigung konnte ein molarer Extinktionskoeffizient für NADPH von $1099,5 \text{ [L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$ oder $[\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}]$ abgelesen werden.

Für NADH ergab sich aus der Geradensteigung ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{380} von $1062,8 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ (siehe Abbildung 31).

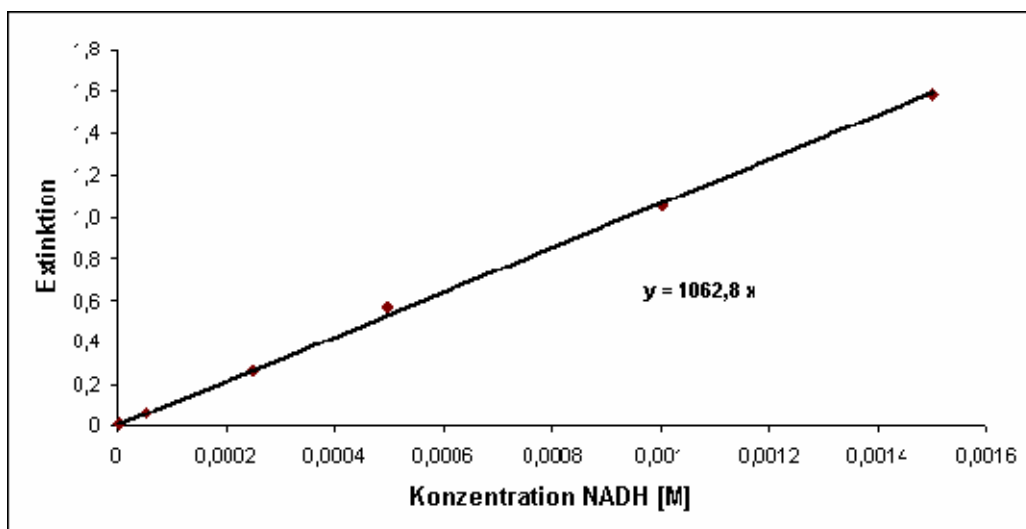


Abb. 31: Molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 380 nm.

16.3.2 Bestimmung K_m -Werte für NADPH und NADH

Für die Bestimmung des K_m -Werts eines Cosubstrates muss die Konzentration des verwendeten Substrates im Sättigungsbereich vorliegen, damit Änderungen in der Substratkonzentration nicht die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Da bei den meisten Substraten Probleme der Vermessung von hohen Substratkonzentrationen auftraten, wurde für diese Arbeit nur für eine Substanz, nämlich Pyruvat, ein apparenter K_m -Wert der beiden Cosubstrate NADH und NADPH bestimmt. Die Reaktionen wurden photometrisch vermessen (vergleiche 12.2). In jedem Reaktionsansatz wurden 7,7 μg Enzym und 0,2 M Pyruvat eingesetzt. Die Aktivitäten wurden fünffach bestimmt und die Werte gemittelt.

In der Sättigungskurve für NADPH erkennt man ein schnelles Übergehen in den Sättigungsbereich (bei etwa 0,3 mM, vergleiche Abbildung 32a). Durch Linearisierung nach Lineweaver-Burk lässt sich der K_m -Wert über den Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse berechnen. Für NADPH ergibt sich ein Wert von 20 μM (Abbildung 32b).

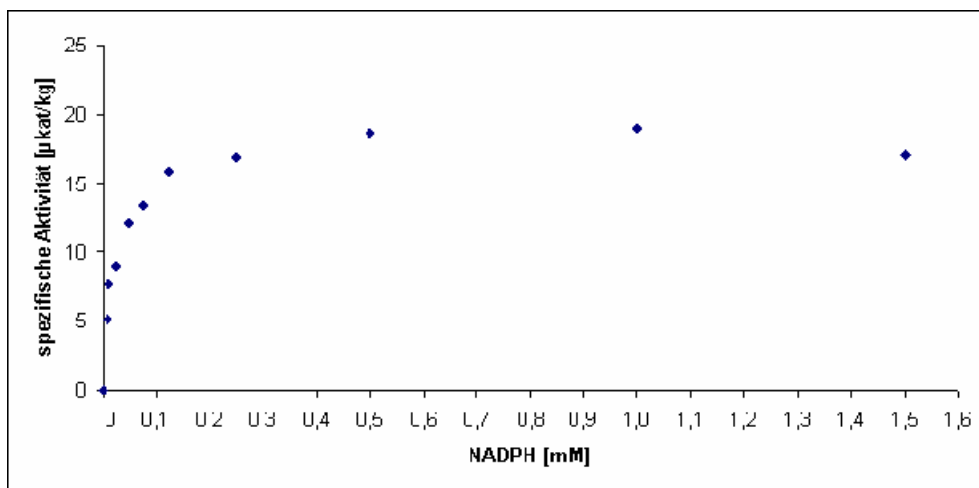


Abb. 32a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der NADPH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat.

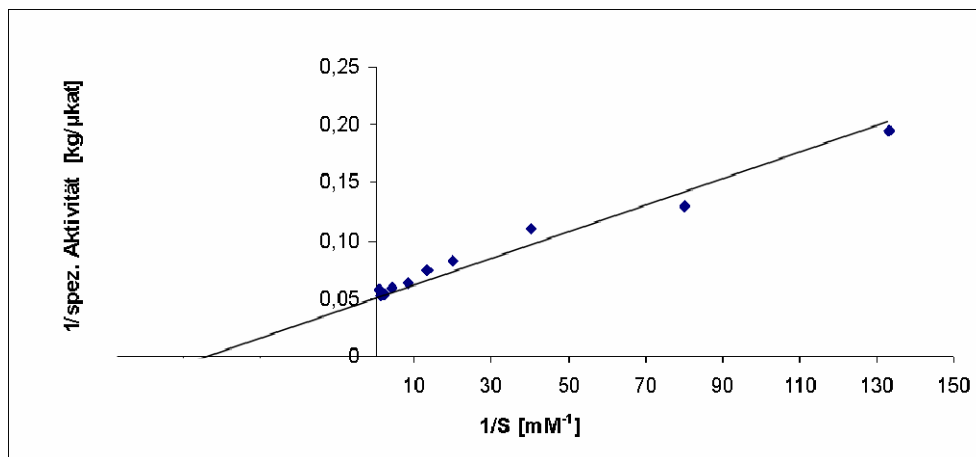


Abb. 32b: Linearisierung der Daten aus Abb. 32a nach Lineweaver-Burk.

Für NADH erfolgte die Inkubation analog wie für NADPH. Verglichen mit der Sättigungskurve von NADPH setzt bei NADH die Sättigung erst bei höheren Konzentrationen (etwa 1,3 mM) ein und die spezifischen Aktivitäten sind niedriger. Aus der linearisierten Auftragung ergibt sich ein apparenter K_m -Wert von 500 μM (Abbildung 33b).

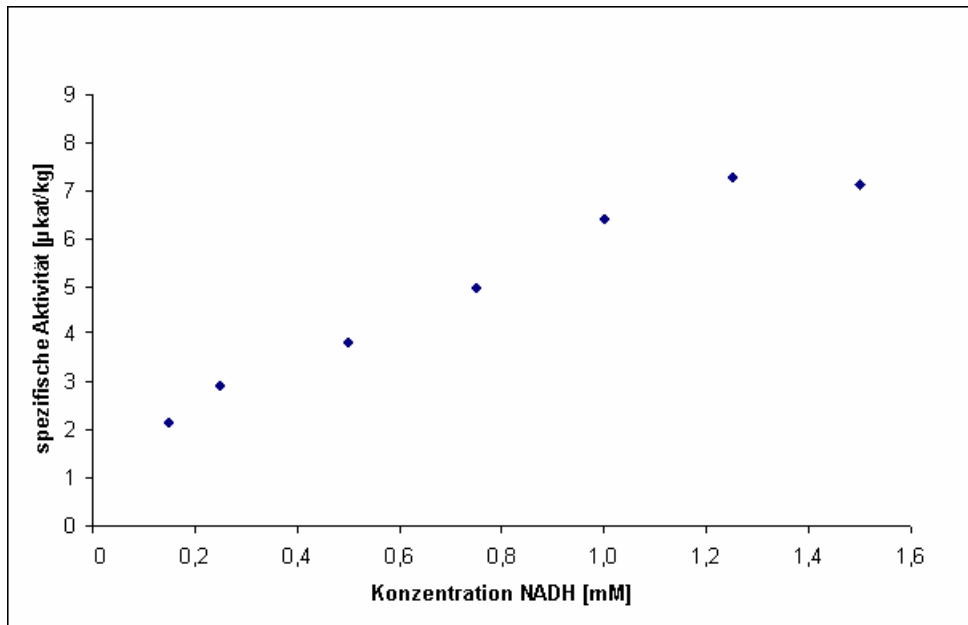


Abb. 33a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der NADH-Konzentration mit Pyruvat als Substrat.

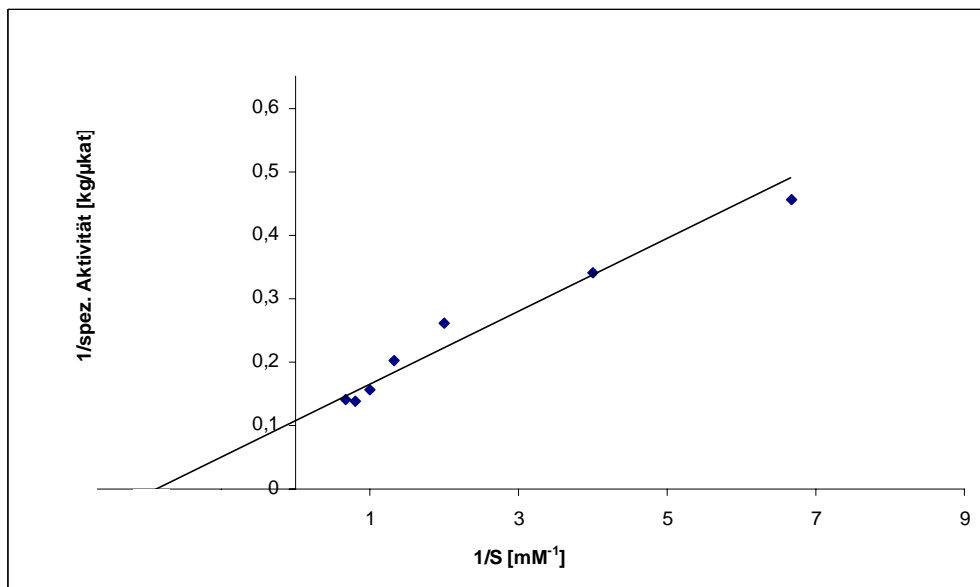


Abb. 33b: Linearisierung der Daten aus Abb. 33a nach Lineweaver-Burk.

16.3.3 Überblick über die Substrate

Für die Charakterisierung der H(P)PR wurden zahlreiche kleinere und größere Substrate getestet. Abbildung 34 gibt eine Zusammenstellung der verwendeten Substratstrukturen.

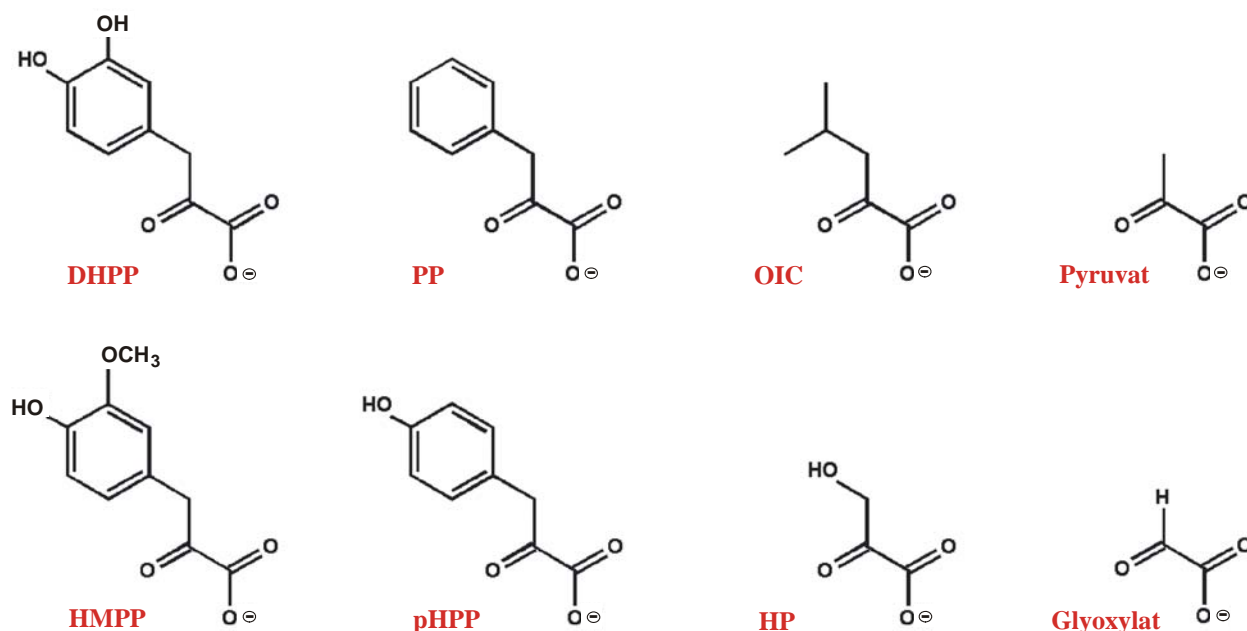


Abb. 34: Substanzen zur Überprüfung der Substratspezifität der H(P)PR.

DHPP = 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat, PP = Phenylpyruvat, OIC = Oxoisocaproat, HMPP = 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpyruvat, pHPP = 4-Hydroxyphenylpyruvat, HP = Hydroxypyruvat.

16.3.4 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP)

Diese Substanz, die als das native Substrat der HPPR angenommen wird, wurde mittels HPLC vermessen. Die Reaktion wurde bei 37°C, mit einer Vorwärmzeit von 4 min. und einer Reaktionszeit von 5 min. durchgeführt. Es wurden Vierfach-Bestimmungen vorgenommen. Von dem Enzym wurden 27,3 µg pro Reaktionsansatz eingesetzt. NADPH lag mit einer Endkonzentration von 6 mM vor. Da pHPP in 20% Ethanol p.a. gelöst wurde, musste darauf geachtet werden, dass in allen Tests der gleiche Ethanolgehalt vorlag, um einen gleichbleibenden Einfluss des Ethanols auf die Enzymaktivität zu gewährleisten. Somit betrug die Ethanolkonzentration im Reaktionsansatz 3,6%. Wie bereits erwähnt, bereiteten hohe Substratkonzentrationen Probleme bei der HPLC-Vermessung. Aus diesem Grund und weil die Ethanolkonzentration möglichst niedrig zu halten war, konnte nicht mehr als 9 mM pHPP für die Bestimmung des K_m -Werts eingesetzt werden. Wie aus der Abbildung 35a ersichtlich,

steigt die Aktivität bis 9 mM stetig an und geht noch nicht in eine Sättigung über. Daher kann der apparente K_m -Wert nur über eine lineare Auftragung abgeschätzt werden. Trägt man die Daten nach einer Lineweaver-Burk Linearisierung auf, so ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse ein apparenter K_m -Wert von 16,6 mM (vergleiche Abbildung 35b).

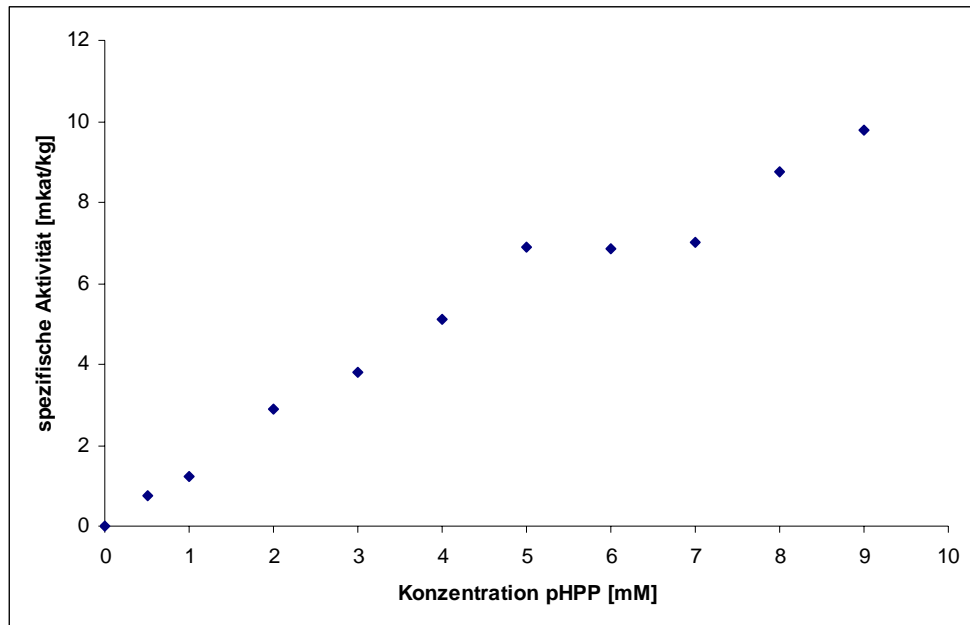


Abb. 35a: Abhängigkeit der spez. Aktivität von H(P)PR von der pHPP-Konzentration.

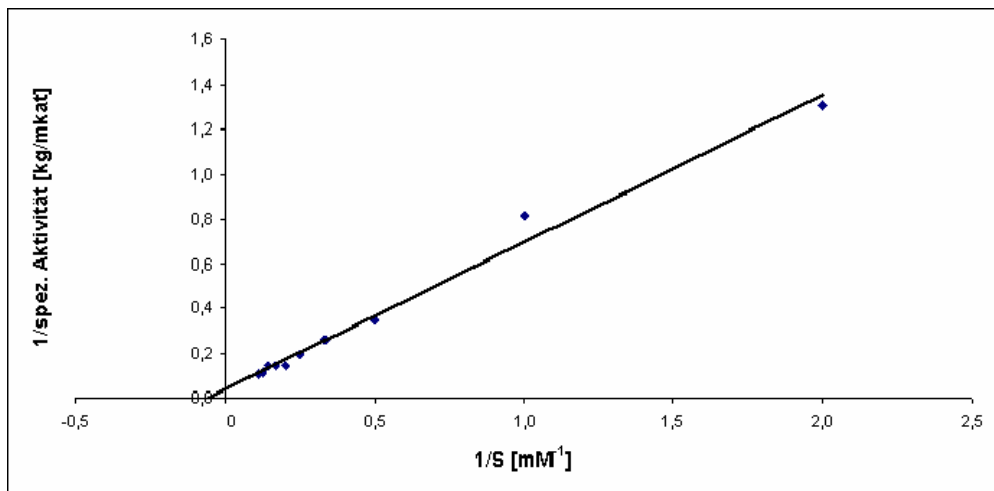


Abb. 35b: Linearisierung der Daten aus Abb. 35a nach Lineweaver-Burk.

Da die HPLC-Methode für die Bestimmung des apparenten K_m -Wertes von pHPP Schwierigkeiten bereitete, wurde zusätzlich versucht, mit Hilfe des Photometers in höheren Konzentrationsbereichen zu messen. Dies war leider aufgrund der relativ hohen Eigen-

Extinktion des pHPP nicht möglich (molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{380} von pHPP: $16,086 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$, Abbildung 36).

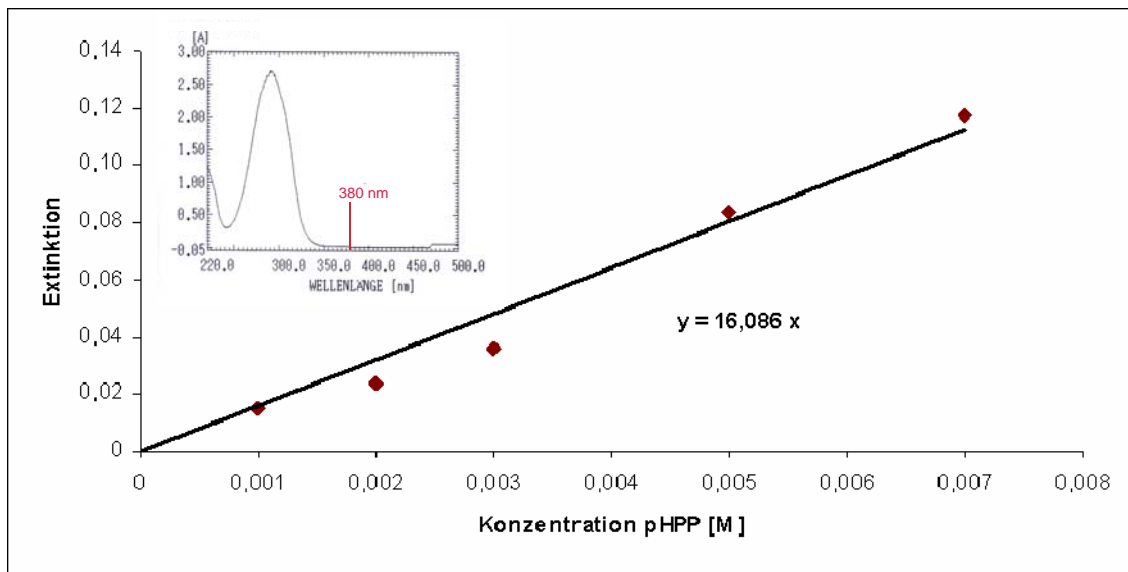


Abb. 36: Molarer Extinktionskoeffizient von pHPP bei 380 nm mit Extinktionsspektrum.

Das gleiche Problem mit der starken Extinktion tauchte besonders bei anderen Substraten auf, die eine Phenylgruppe enthielten.

16.3.5 Spezifische Aktivitäten mit Phenylpyruvat-Derivaten als Substrate

Da aufgrund der Extinktion dieser Substrate eine photometrische Bestimmung der K_m -Werte nicht möglich war, aber dennoch die Akzeptanz dieser Substanzen verglichen werden sollte, wurden die spezifischen Aktivitäten bei einer Substratkonzentration unter den gleichen Bedingungen photometrisch bestimmt. Hierfür wurden 770 ng Enzym, 0,5 mM NADPH und 1 mM Substrat bei 37°C und 380 nm vermessen. Es wurden Sechsfach-Bestimmungen durchgeführt und die Werte gemittelt. Als Resultat ist eine höhere spezifische Aktivität für Dihydroxyphenylpyruvat (DHPP) gegenüber dem 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) festzustellen (Abbildung 37). Die spezifische Aktivität mit 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpyruvat (HMPP) als Substrat ist etwas weniger als halb so groß wie bei pHPP. Phenylpyruvat (PP) schließlich wird nur sehr schlecht von der H(P)PR akzeptiert. Bezogen auf die höchste Aktivität mit DHPP als Substrat, wird pHPP mit 52,3%, HMPP mit 22,7% und PP nur mit 1% der spezifischen Aktivität umgesetzt.

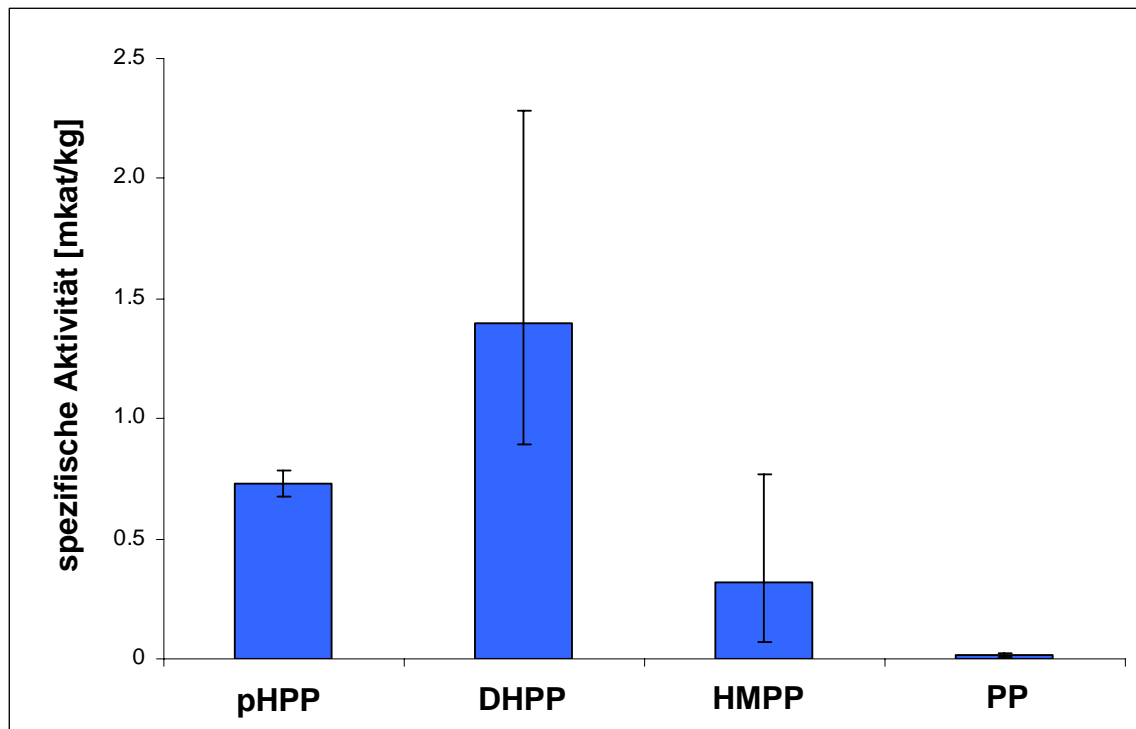


Abb. 37: Spezifische Aktivitäten der H(P)PR mit Phenylpyruvaten als Substrate. Die Fehlerbalken geben den größten und kleinsten Messwert der Sechsfachbestimmungen an.

16.3.6 Pyruvat

Pyruvat absorbiert ebenfalls bei 380 nm im Photometer, der molare Extinktionskoeffizient liegt mit $0,5749 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ aber deutlich niedriger als bei den Phenylpyruvaten. Daher konnte der apparente K_m -Wert dieses Substrates photometrisch bestimmt werden.

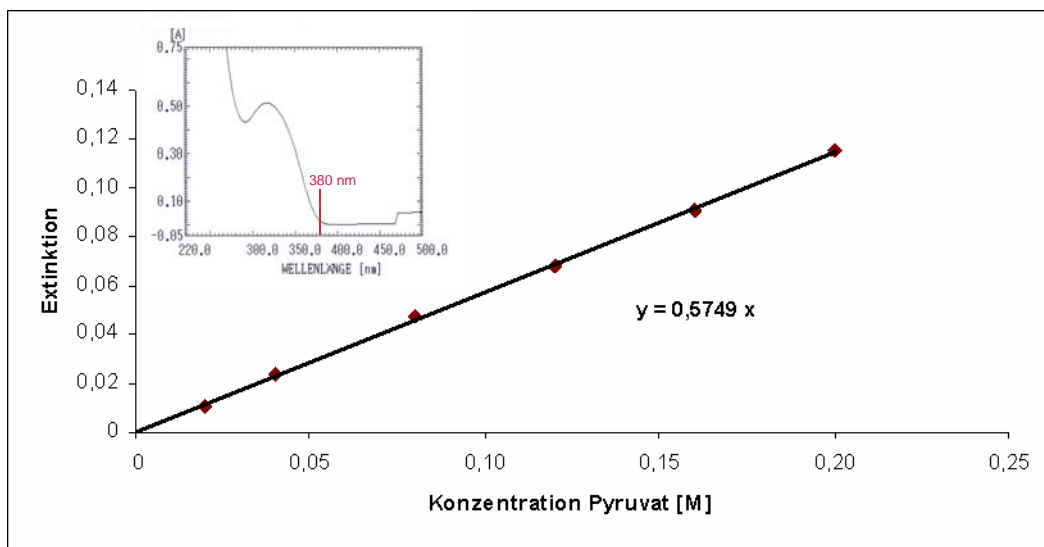


Abb. 38: Molarer Extinktionskoeffizient von Pyruvat bei 380 nm mit Extinktionsspektrum.

Die Testbedingungen entsprachen im Allgemeinen der Methode, die unter 12.2 beschrieben wurde. Von dem Enzym wurden 30,8 μg pro Test eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde für jede Pyruvatkonzentration viermal gemessen und ein Mittelwert gebildet. Durch Auftragen der spezifischen Aktivität gegen die Pyruvatkonzentration ergab sich der in Abbildung 39a dargestellte Verlauf der Sättigungskurve. Bei hohen Pyruvatkonzentrationen ab etwa 100 mM ist Substratsättigung zu beobachten. Aus der nach Lineweaver-Burk aufgetragenen Linearisierung ergibt sich ein apparenter K_m -Wert von 25 mM (Abbildung 39b).

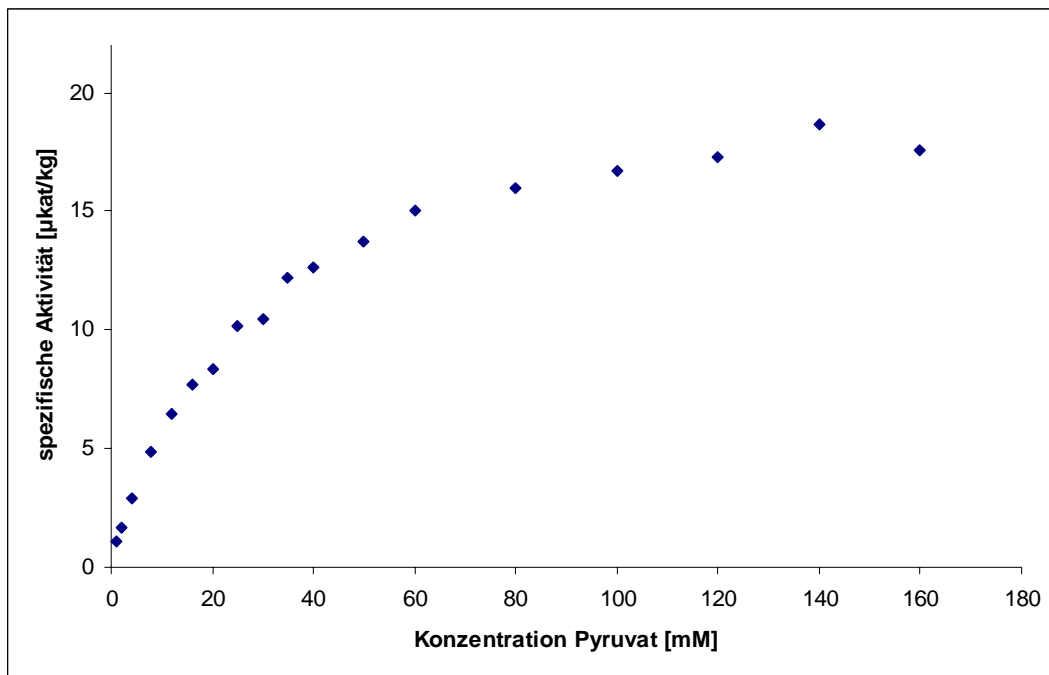


Abb. 39a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Pyruvatkonzentration.

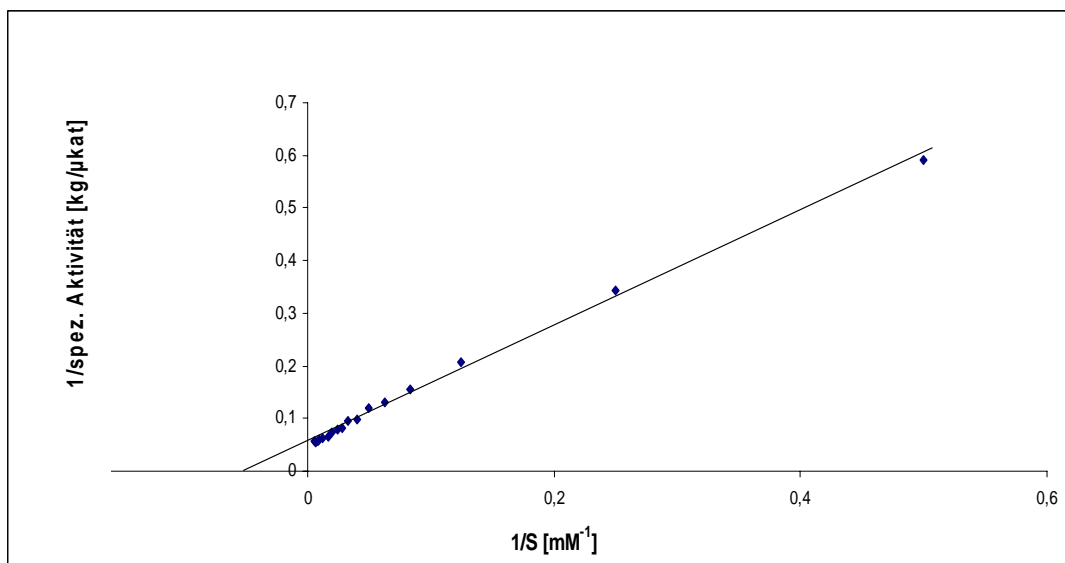


Abb. 39b: Linearisierung der Daten aus Abb. 39a nach Lineweaver-Burk.

16.3.7 Glyoxylat

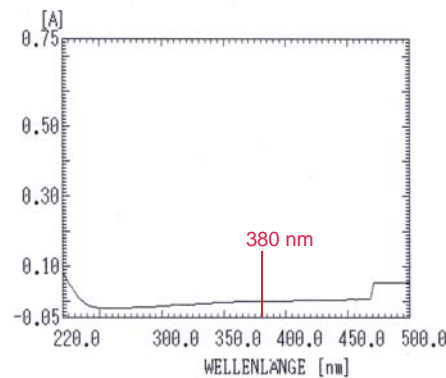


Abb. 40: Extinktionsspektrum von Glyoxylat.

Wie man am Extinktionsspektrum von Glyoxylat sehen kann, zeigt diese Substanz keine Eigenextinktion bei 380 nm (Abbildung 40). Was allerdings bei dieser Substanz Probleme bereitete, waren die sehr hohen spezifischen Aktivitäten. Dadurch musste die Enzymmenge stark reduziert werden, dass auch bei kleinen Substratkonzentrationen eine hinreichend lange Linearität der Reaktion gegeben war. So wurde schließlich eine Enzymmenge von 154 ng und eine NADPH-Konzentration von 0,75 mM pro Reaktionsansatz verwendet. Die stark verdünnten Proteinlösungen zeigten bereits nach kurzer Zeit (etwa 5 min.) einen Aktivitätsverlust, so dass die Proteinlösung möglichst kurz vor der Reaktion verdünnt werden musste. Trotzdem zeigte sich diese Aktivitätsschwankung in den resultierenden Reaktionskurven wieder. Die Werte unterschieden sich bis zu 67% vom späteren Mittelwert. Diese Variabilität machte Sechsfach-Messungen nötig, um einen hinreichend aussagekräftigen apparenten K_m -Wert bestimmen zu können. Die Reaktionskurve ist in Abbildung 41a wiedergegeben. Ab einer Glyoxylat-Konzentration von 5 mM ist das Enzym gesättigt. Aus der in Abbildung 41b dargestellten linearen Auftragung nach Lineweaver-Burk ergibt sich ein apparenter K_m -Wert von 2 mM.

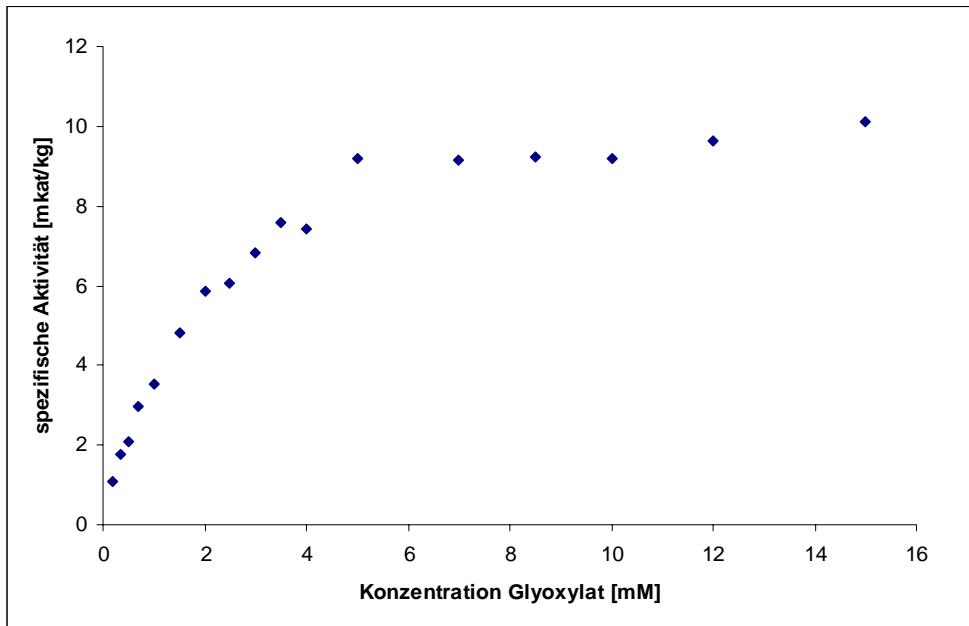


Abb. 41a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Glyoxylatkonzentration.

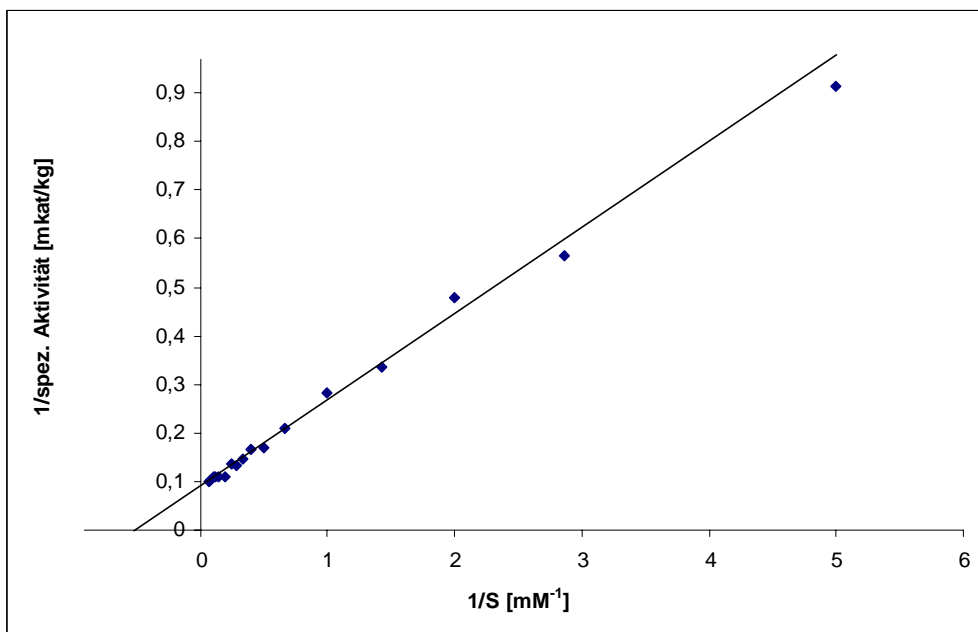


Abb. 41b: Linearisierung der Daten aus Abb. 41a nach Lineweaver-Burk.

16.3.8 Hydroxypyruvat

Hydroxypyruvat zeigt bei 380 nm einen relativ niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{380} = 2,8703 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$, Abbildung 42), so dass von einer nur geringen Beeinflussung der photometrischen Messungen durch das Substrat ausgegangen wird.

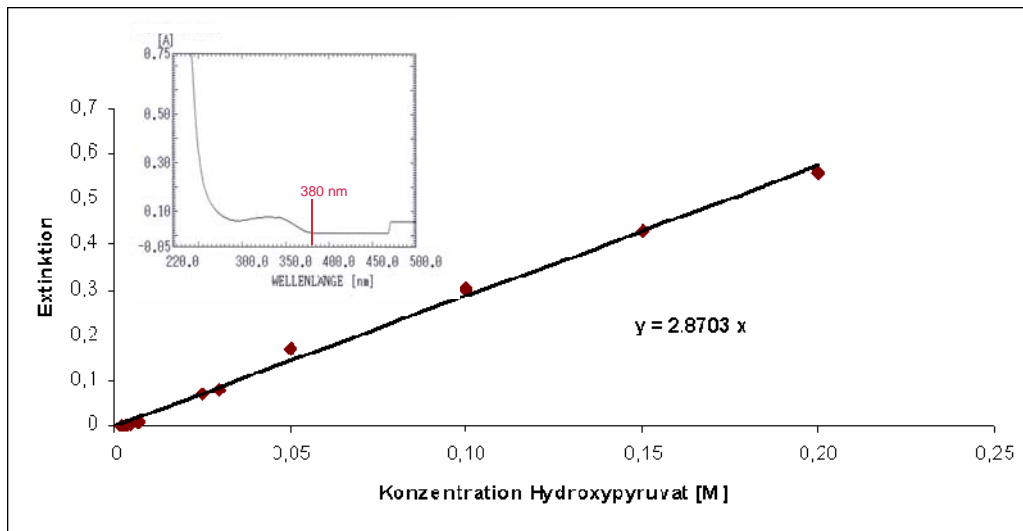


Abb. 42: Molarer Extinktionskoeffizient von Hydroxypyruvat bei 380 nm mit Extinktionsspektrum.

Wie schon bei Glyoxylat, so musste auch bei diesem Substrat die eingesetzte Enzymmenge aufgrund der hohen spezifischen Aktivität auf 154 ng pro Test verringert werden. Die Versuchsdurchführung entsprach der für Glyoxylat. Es wurde ebenfalls wegen der recht hohen Variabilität der Messwerte eine Sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

Der resultierende Kurvenverlauf (Abbildung 43a) zeigt ab einer Substratkonzentration von etwa 3 mM einen deutlichen Abfall. Hydroxypyruvat ist das einzige getestete Substrat, bei dem eine Substrathemmung festgestellt wurde. Eine Lineweaver-Burk-Aufragung der Werte (Abbildung 43b) ergibt einen apparenten K_m -Wert von etwa 1 mM. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch die beobachtete Substrathemmung der eigentliche K_m -Wert höher liegt.

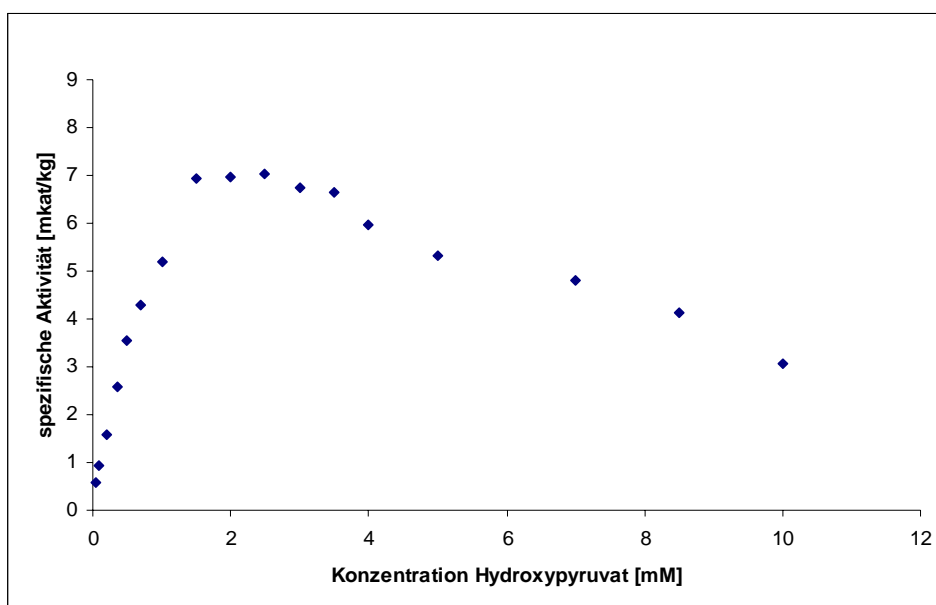


Abb. 43a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Hydroxypyruvatkonzentration.

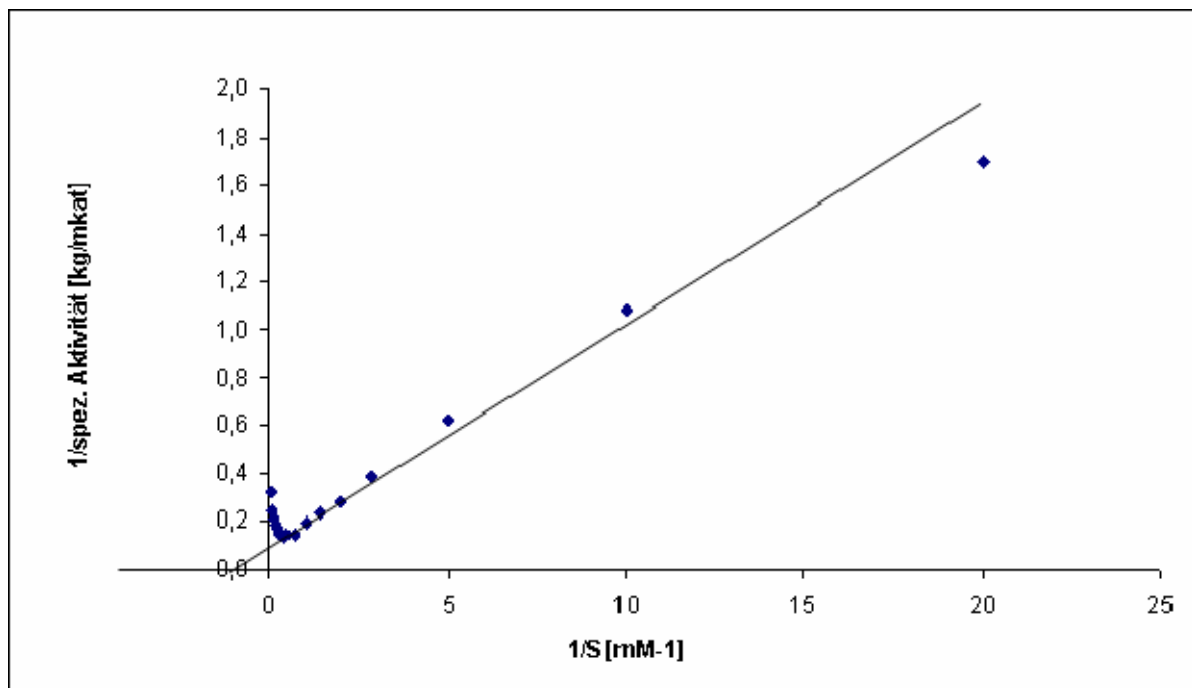


Abb. 43b: Linearisierung der Daten aus Abb. 43a nach Lineweaver-Burk.

Da Hydroxypyruvat als Lithiumsalz verwendet wurde, wurde getestet, ob Lithium einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, bzw. ob die beobachtete Substrathemmung durch Hydroxypyruvat in Wirklichkeit eine Hemmung durch Lithium sein könnte. Lithiumchlorid wurde dafür bis zu einer Konzentration von 60 mM einer Reaktionsreihe mit Pyruvat als Substrat zugesetzt, aber es wurde keine Beeinflussung der Enzymaktivität beobachtet. Demnach ist die erfasste Substrathemmung tatsächlich durch Hydroxypyruvat hervorgerufen.

16.3.9 Oxoisocaproat

Der apparente K_m -Wert von Oxoisocaproat wurde, wie bei den anderen Substraten auch, photometrisch bestimmt. Zunächst musste aber der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{380} bestimmt werden, um den systematischen Fehler abschätzen zu können. Wie aus Abbildung 44 ersichtlich, liegt der molare Extinktionskoeffizient von Oxoisocaproat bei $3,5817 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ und damit in einem Bereich, wo gerade bei höheren Konzentrationen Probleme auftauchen können.

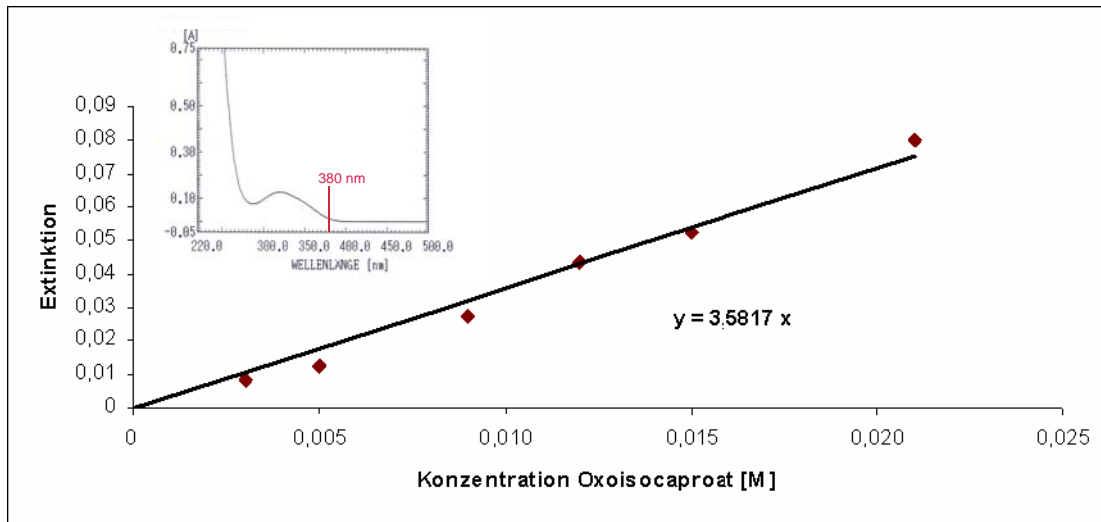


Abb. 44: Molarer Extinktionskoeffizient von Oxoisocaproat bei 380 nm mit Extinktionsspektrum.

Für die Bestimmung des K_m -Werts wurden 1,54 μg Enzym und 0,5 mM NADPH eingesetzt. Aufgrund recht starker Schwankungen der Aktivitäten wurde eine Siebenfach-Bestimmung vorgenommen. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 45a dargestellt. Wie man erkennen kann, konnte keine Substratsättigung erreicht werden, was allerdings eine Voraussetzung für die Linearisierung nach Lineweaver-Burk ist. Dennoch wurde eine linearisierte Auftragung nach Lineweaver-Burk verwendet, um den apparenten K_m -Wert abschätzen zu können. Durch diese Linearisierung ergäbe sich ein apparenter K_m -Wert von etwa 50 mM (Abbildung 45b).

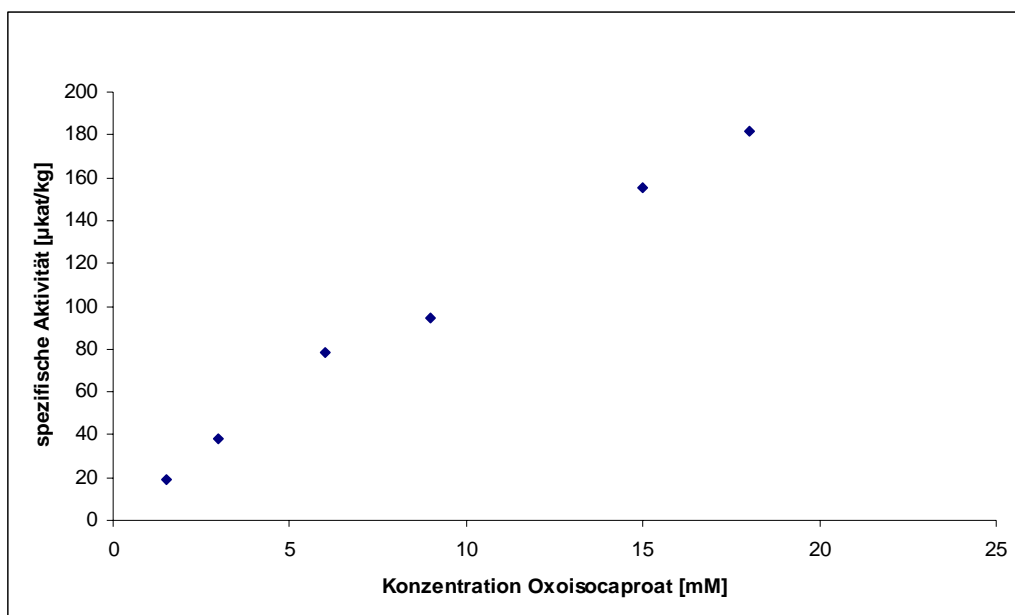


Abb. 45a: Abhängigkeit der spez. Aktivität der H(P)PR von der Oxoisocaproatkonzentration.

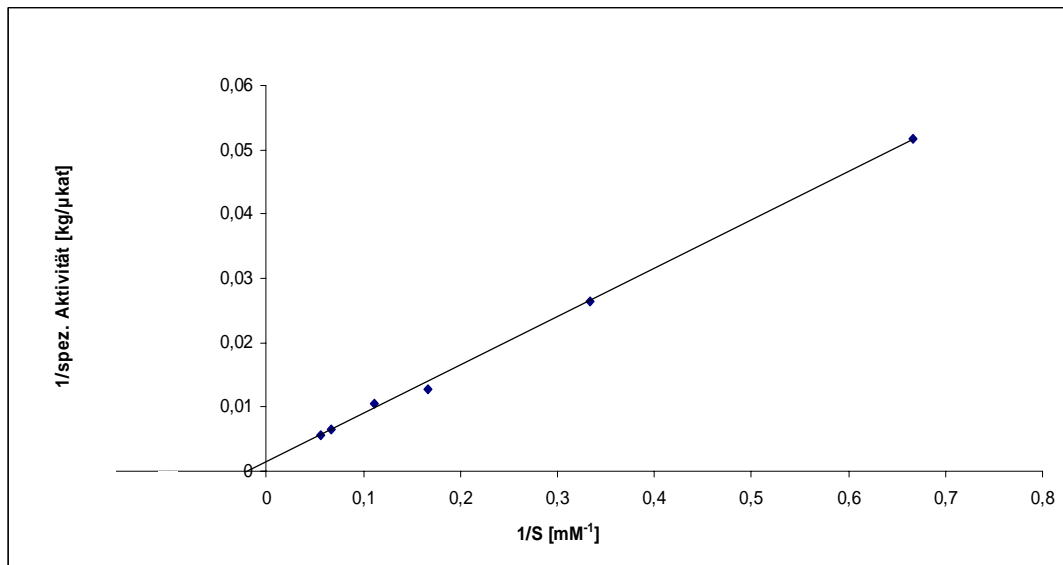


Abb. 45b: Linearisierung der Daten aus Abb. 45a nach Lineweaver-Burk.

16.4 Untersuchung des Einflusses des His-Tag auf die Aktivität der H(P)PR

Für die Enzymcharakterisierung wurde H(P)PR-Protein verwendet, das den bei der Expression angehängten His-Tag mit der Thrombin-Schnittstelle (insgesamt 16 AS) noch enthielt. Um sicherzustellen, dass diese zusätzlichen Aminosäuren keinen großen Einfluss auf die Enzymaktivität haben, wurde zum einen mittels Thrombin der His-Tag abgespalten. Zum anderen wurde in den pET-24d-Vektor ligiertes Protein auf Aktivität getestet. Dieses Protein enthält ebenfalls einen His-Tag, der aber am C-Terminus angehängt ist. Um die Aktivität vergleichen zu können, wurden Tests mit den oben aufgeführten H(P)PR-Proteinchargen, die sich im Vorhandensein und in der Position des His-Tags unterschieden, durchgeführt (5 min Reaktionszeit, 37°C) und durch HPLC vermessen. Das Ergebnis des Aktivitätsvergleiches ist in Abbildung 46 dargestellt. Da die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Vergleichsansätzen stammen, wurden die Aktivitäten mit einer Enzymcharge verglichen, und die spezifischen Aktivitäten in Prozent angegeben. Das Enzym mit dem am C-Terminus angehängten His-Tag zeigt die niedrigste spezifische Aktivität. Dagegen ist die Aktivität des Proteins ohne His-Tag am höchsten (37,3 bzw. 21,3 % höher, verglichen mit den beiden Chargen mit N-terminalem His-Tag). Die Aktivitäten der Enzymchargen mit dem His-Tag am N-Terminus liegen dazwischen und weichen um 13,2% voneinander ab.

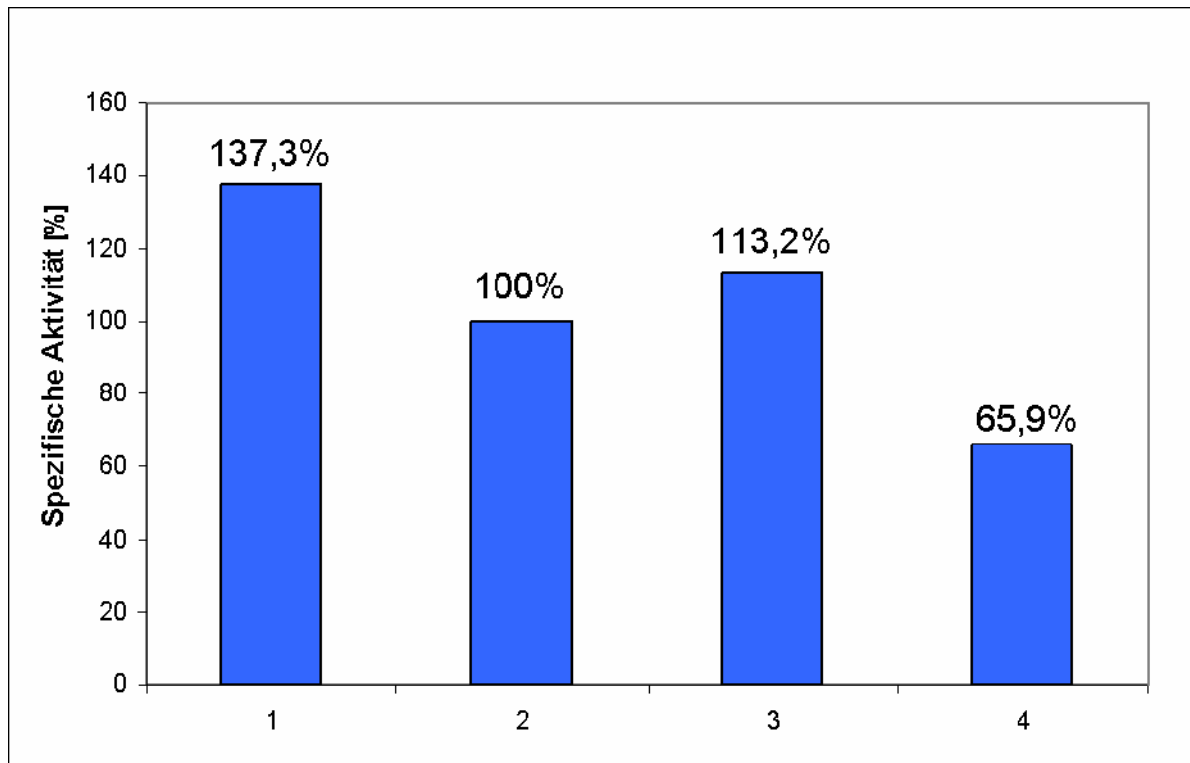


Abb. 46: Aktivitätsvergleich unterschiedlicher Enzymchargen der H(P)PR. 1 = Enzym ohne His-Tag, 2 und 3 = Enzym mit N-terminalem His-Tag, 4 = Enzym mit C-terminalem His-Tag.

16.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größe des H(P)PR-Proteins wurde mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie, auch Gelfiltration genannt, bestimmt. Hierzu nutzt man eine poröse Gelmatrix in einer FPLC-Säule zur Auftrennung von Proteinen. Zunächst musste die Säule mit Standard-Proteinen kalibriert werden, um die Proteingröße mit dem Elutionsvolumen in Zusammenhang zu bringen. Die entstandene „Eichkurve“ ist in Abbildung 47 dargestellt. Nach 44,25 min kam das größte Protein (Alkoholdehydrogenase, 150 kDa) von der Säule, während das kleinste Protein (Ribonuklease A, 13,7 kDa) nach 67,25 min eluiert wurde. Anschließend wurde das H(P)PR-Protein zweimal unter den gleichen Bedingungen eluiert. Eine durchschnittliche Elutionszeit von 47,87 min. lässt auf eine Größe von 59,23 kDa schließen. In Abbildung 47 wurde die Elutionszeit der H(P)PR ebenfalls eingetragen (roter Punkt).

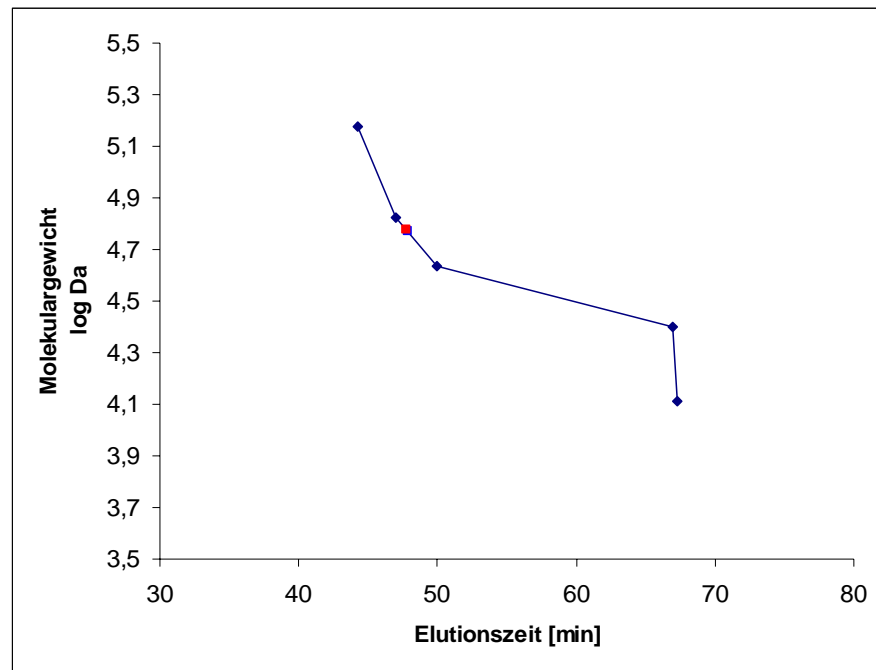


Abb. 47: Eichgerade für die Größenausschlusschromatographie mit Standardproteinen (Alkoholdehydrogenase 150 kDa, Rinderserumalbumin 67 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carboanhydrase 29 kDa, Ribonuklease A 13,7 kDa); die Elutionszeit der H(P)PR ist in rot markiert.

Von den aufgefangenen Fraktionen wurden Enzymtests angesetzt und mittels HPLC ausgewertet. Es wurden jeweils 50 µl der Elutionsfraktionen als Enzym eingesetzt und für 10 min. bei 37°C inkubieren gelassen (vergleiche 12.1). Die gemessene Enzymaktivität korrelierte mit dem bei der Größenausschlusschromatographie eluierten Protein (vergleiche Abbildung 48).

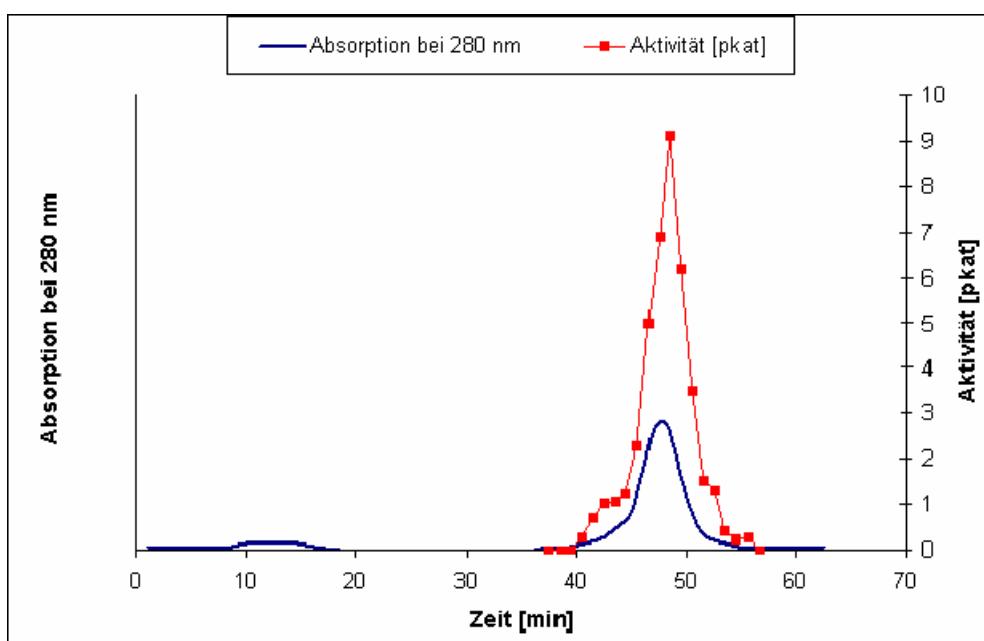


Abb. 48: Größenausschlusschromatographie mit Aktivitätsmessung der Fraktionen.

16.6 Untersuchung zur Bildung von D- oder L-pHPL

Von der Nukleotidsequenz her wurde die H(P)PR in die Enzymgruppe der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen eingeteilt. Um diese Einteilung zu bestätigen, sollte die Chiralität des gebildeten pHPLs untersucht werden. Zunächst wurde ein Enzymtest, wie unter 12.1 beschrieben, angesetzt und über die HPLC aufgetrennt. Dabei wurde der pHPL-Peak gesammelt, gefriergetrocknet und anschließend über eine chirale HPLC-Säule analysiert (12.4). Wie in Abbildung 49a zu erkennen ist, wurde das von der H(P)PR gebildete pHPL nach 27,66 min detektiert. Das pHPL-Razemat wurde ebenfalls unter den gleichen Bedingungen über die chirale Säule getrennt. Es wurden zwei Peaks, einer bei 22,49 min. und einer bei 28,19 min. erfasst. Durch Zumischen konnte bestätigt werden, dass das von der H(P)PR gebildete pHPL mit dem zweiten Razemat-pHPL-Peak (28,19 min.) identisch ist. Zur Zuordnung der beiden Razemat-Peaks wurde das L-pHPL-Isomer der Firma Interchim (Montlucon, Frankreich) ebenfalls vermessen (Abbildung 49b). Leider stellte sich heraus, dass diese Substanz extrem verunreinigt war. Dennoch entspricht der zweitgrößte Peak (22,45 min.) des verunreinigten L-Isomers dem ersten Peak des Razemates, was durch Zumischen untersucht wurde. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass durch Katalyse der H(P)PR das D-pHPL gebildet wird.

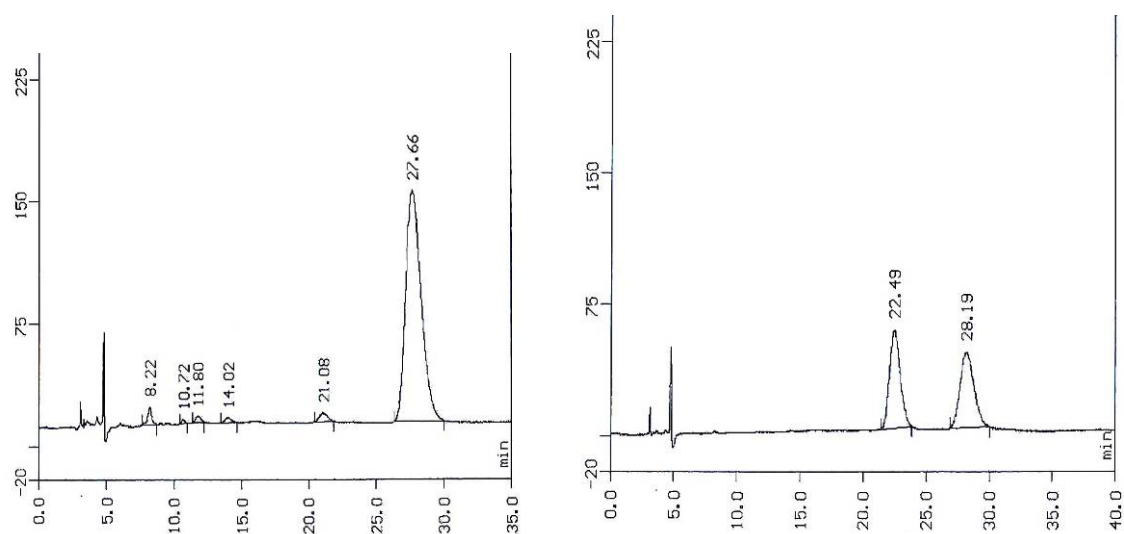


Abb. 49a: Auftrennung von gebildetem pHPL (links) und von D,L-pHPL (rechts) über eine chirale HPLC-Säule.

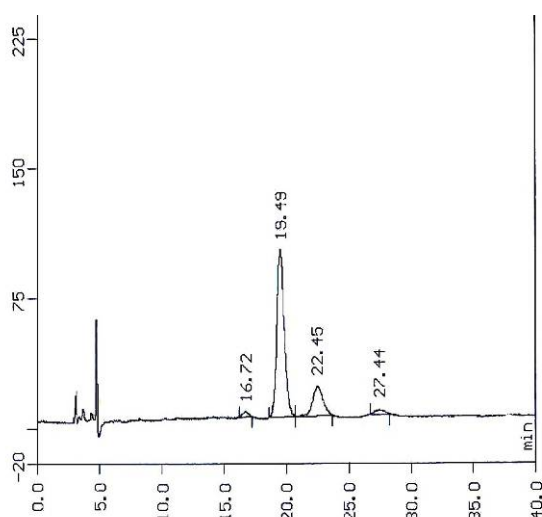


Abb. 49b: Auftrennung von angeblich 98% reinem L-PHPL über eine chirale HPLC-Säule.

17 Kristallstrukturanalyse

17.1 Kristallisation und Datensammlung

Das über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und 2'5'-ADP-Sepharose aufgereinigte H(P)PR-Protein wurde im sitting-drop-Verfahren unter verschiedenen Bedingungen zur Kristallisation angesetzt. Dabei zeigten sich nach kurzer Zeit unterschiedliche Kristallformen, wobei die meisten Kristalle sich nicht für eine Röntgenstrukturanalyse eigneten, da sie zu klein waren oder nur zweidimensionale Formen aufwiesen. Ein Kristallcluster (Abbildung 50), der unter der Bedingung 30% MPD, 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 bei 4°C wuchs, wurde in kleinere Fragmente zerlegt und konnte am Synchrotron in Berlin an der Beamline Bessy II mit einer Auflösung von 1,47 Å vermessen werden. Ein Kryoschutz war hier nicht nötig, da bereits in den Kristallisationsbedingungen 30% MPD vorhanden war. Eine spätere Auswertung des Datensatzes ergab die Raumgruppe $P3_121$ mit einer Zelldimension von $a = b = 62,9$ Å, $c = 153,3$ Å. Weitere Kenndaten des Datensatzes sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

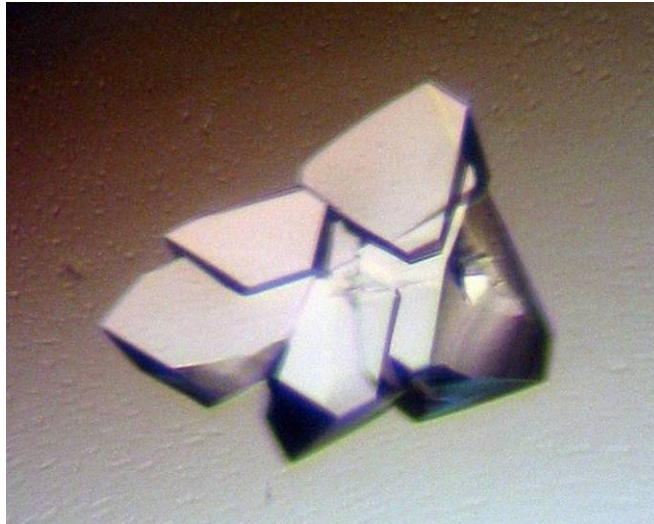


Abb. 50: Kristallcluster der heterolog expremierten H(P)PR mit N-terminalem His-Tag.

Für die Kristallisation der Komplexstruktur mit Substraten wurde das gereinigte Protein (13.1) zunächst mit 2 mM NADP^+ versetzt und unter den Bedingungen der nativen Struktur zur Kristallisation angesetzt. Da das Protein aber nicht kristallisierte, mussten neue Bedingungen ausprobiert werden. Schließlich wuchsen unter 20% PEG 1000, 0,1 M Imidazol-Puffer pH 7,5, 0,2 mM DTT und 4 mM pHPP bei 4°C tetragonal-bipyramidale Kristalle. Diese waren allerdings sehr klein. Der gleiche Ansatz bei 26°C zeigte wesentlich größere Kristalle, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet schienen (Abbildung 51). Als Kryoschutz zur Vermeidung von Eiskristallen bei der Stickstoffkühlung wurde 20% Glycerol verwendet, durch das der Kristall im Kryoloop kurz durchgezogen wurde. Verweilte der Kristall zu lange in der Kryolösung, so bildeten sich feine Risse und der Kristall war nicht mehr für eine Vermessung geeignet.

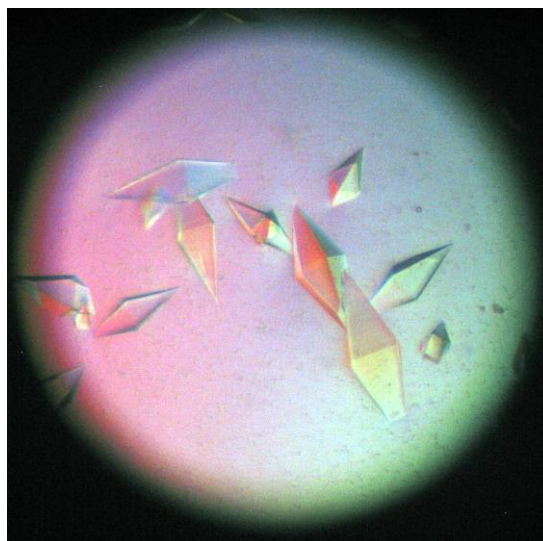


Abb. 51: Tetragonal-bipyramidale Kristalle der H(P)PR mit NADP^+ und pHPP.

Mehrere Kristalle, die mit NADP^+ und pHPP kokristallisiert wurden, wurden an der Drehanode, die im Institut für Pharmazeutische Chemie vorhanden ist, bei einer Wellenlänge von 1,5418 Å, vermessen. Ein Datensatz, der bis 2,2 Å streute, wurde für das spätere Docking verwendet (vergleiche 13.5). Der Datensatz ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Kristalldaten	Nativer Datensatz	NADP^+ -Komplex
Wellenlänge (Å)	0,91838	1,5418
Raumgruppe	$P3_121$	$P4_12_12$
Parameter der Einheitszelle (Å)	$a = b = 62,9$ $c = 153,3$	$a = b = 63,5$ $c = 222,6$
Auflösungsbereich (Å)	50,0 – 1,47 (1,50 – 1,47)	30,0 – 2,2 (2,25 – 2,20)
Zahl der gemessenen Reflexe	339466	293424
Zahl der unabhängigen Reflexe	58971	23761
Vollständigkeit der Daten (%)	96,9 (99,1)	98,1 (81,4)
$I/\sigma(I)$	23,9 (3,4)	24,3 (2,6)
$R(I)_{\text{sym}}$ (%)	7,0 (46,6)	9,9 (55,9)

Tabelle 2: Statistiken des nativen und des NADP^+ -Komplex-Datensatzes der H(P)PR. Die Werte in den Klammern gelten für den höchsten Auflösungsbereich.

17.2 Strukturlösung und Verfeinerung

Für die Strukturlösung des nativen Datensatzes wurden verwandte Strukturen der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase Proteinfamilie verwendet (1gdh, 1psd, 1dxy, 2dld; siehe Tabelle 3). Der molekulare Ersatz mit unterschiedlichen Programmen führte zu keinem Ergebnis. Daher wurde ein Modell mit dem Swiss-Model Server (Schwede et al., 2003) erstellt, bei dem drei verwandte Strukturen verwendet wurden (1gdh, 1psd, 2nad; vergleiche Tabelle 3).

Organismus	Protein	PDB	AS	Identität (%)
<i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	Glycerat Dehydrogenase	1gdh	320	30.99
<i>Escherichia coli</i>	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase	1psd	409	27.80
<i>Pseudomonas sp.</i>	NAD-abhängige Format Dehydrogenase	2nad	393	25.88
<i>Lactobacillus casei</i>	D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase	1dxy	333	22.68
<i>Lactobacillus helveticus</i>	D-Laktat Dehydrogenase	2dld	337	22,04

Tabelle 3: Für den molekularen Ersatz verwendete D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen, Identität auf Aminosäurebasis bezogen auf das H(P)PR-Protein.

Von diesem Modell wurden 30%, vornehmlich der Cosubstrat-Bindedomäne, verwendet, um ein Suchmodell für den molekularen Ersatz zu erstellen (Abbildung 52, in rot dargestellt). Mit diesem kleineren Modell konnte eine Lösung mit dem Programm Phaser erlangt werden (log likelihood gain = 28,3). Die resultierende Struktur wurde für die Phasenerweiterung und Optimierung des Modells in Arp/wArp (Lamzin und Wilson, 1993) verwendet. Nach mehreren Verfeinerungsschritten wurde eine fast vollständige Struktur mit 298 Aminosäuren, aufgeteilt in fünf Polypeptidketten, erhalten, die weiter in CNS (Brunger et al., 1998) und SHELXL (Sheldrick und Schneider, 1997) verfeinert wurde.



Abb. 52: Mit dem Programm Swiss-Model erstelltes Modell, von dem der in rot gekennzeichnete Teil zur Strukturlösung der H(P)PR mit dem Programm Phaser verwendet wurde. Im oberen Teil befindet sich die Substrat-Bindedomäne, im unteren Teil die Cosubstrat-Bindedomäne.

Für die Strukturlösung des Komplexdatensatzes wurde die native Struktur als Modell für den molekularen Ersatz verwendet. Die resultierende Dichte zeigte deutlich ein NADP⁺-Molekül, das daraufhin zum Protein hinzugefügt und zusammen mit dem Protein mit den Programmen CNS und SHELXL verfeinert wurde. An der Stelle, an der das Substrat binden würde, wurde keine eindeutige Dichte für pHPP beobachtet.

Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsdaten ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Verfeinerungsdaten	Native Struktur	NADP ⁺ -Komplex-Struktur
Programm für Verfeinerung	SHELXL	SHELXL
Auflösung (Å)	10 – 1,47	10 – 2,2
R _{cryst} (Fo > 4σ Fo; Fo) (%)	14,1; 14,9	19,2; 21,1
R _{free} (Fo > 4σ Fo; Fo) (%)	19,3; 20,3	23,5; 26,0
verfeinerte Aminosäurereste	312	311
Wassermoleküle	290	144
Ligandenatome		48
RMSD, Bindungswinkel (°)	2,3	1,8
RMSD, Bindungslängen (Å)	0,012	0,007
<i>Ramachandran Plot</i> (%)		
besonders bevorzugt	90,2	88,3
zusätzlich erlaubt	9,4	11,3
allgemein erlaubt	0,0	0,0
verboten	0,4	0,4
<i>Durchschnittlicher B-Faktor</i> (Å ²)		
Proteinatome	23,6	30,1
Hauptkette	21,0	29,0
Seitenkette	26,4	31,2
Wassermoleküle	34,6	35,4
Liganden		29,6
PDB code	3ba1	3baz

Tabelle 4: Statistik der Verfeinerung der nativen Struktur und der Komplexstruktur mit NADP⁺.

17.3 Kristallstruktur der H(P)PR

Die Struktur der H(P)PR besteht aus 312 Aminosäuren und ist in 2 Domänen unterteilt. Der am N-Terminus befindliche His-Tag und die erste Aminosäure sind in der Elektronendichte nicht zu sehen. Zwischen den beiden Domänen liegt die katalytische Spalte. Zur Domäneneinteilung wurde das Programm Promotif (Hutchinson und Thornton, 1996) verwendet. Demnach besteht die kleinere der beiden Domänen, die auch als die Substrat-Bindedomäne bezeichnet wird, aus den Aminosäuren 2 – 100 und 285 – 313. Dabei befinden sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus in dieser Domäne. Die größere Domäne, die Cosubstrat-Bindedomäne, ist aus den Aminosäuren 101 – 284 aufgebaut (vergleiche Abbildung 53b).

Zur Verdeutlichung der Proteinstruktur wurde ein Topologie-Diagramm mit dem Programm TOPS angefertigt (Westhead et al., 1999). Dies zeigt in einfacher Weise den strukturellen Aufbau der H(P)PR. Aus Abbildung 53a ist ersichtlich, dass die Substrat-Bindedomäne aus einem parallelen fünfsträngigen β -Faltblatt besteht, das von 5 Helices und einer 3_{10} -Helix umgeben ist. Während die Helices 3_{10} , α_2 , α_3 und α_4 auf der distalen Seite des Proteins verlaufen, liegen die α_1 -Helix und die durch den C-Terminus gebildete α_5 -Helix auf der proximalen Seite.

Die Cosubstrat-Bindedomäne ist aus einem siebensträngigen β -Faltblatt aufgebaut, das von sechs α -Helices und vier 3_{10} -Helices flankiert wird. Die Helix α_B bildet mit der nachfolgenden 3_{10} -Helix eine Schlaufe, die von der Cosubstrat-Bindedomäne absteht.

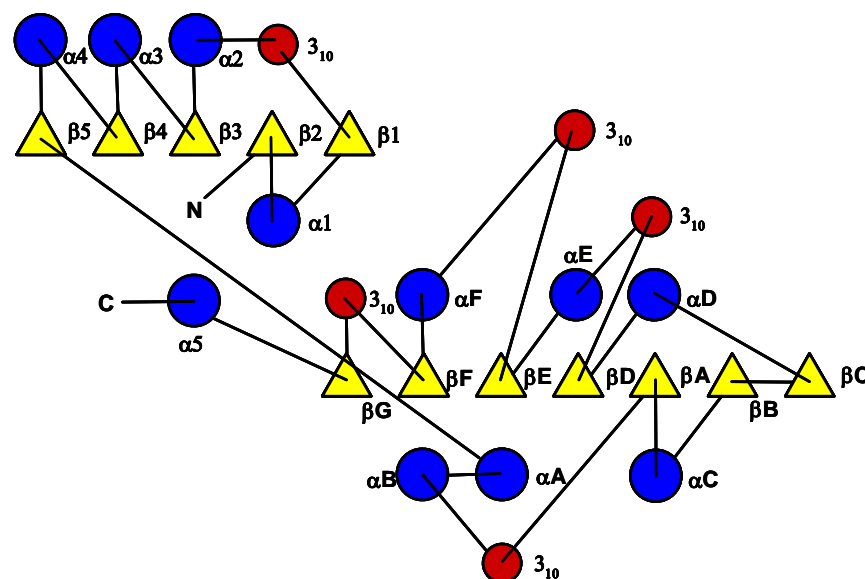


Abb. 53a: Topologie-Diagramm der H(P)PR. Gelb: β -Faltblatt, Blau: α -Helix, Rot: 3_{10} -Helix. Die Substrat-Bindedomäne ist links oben, die Cosubstrat-Bindedomäne rechts unten dargestellt.

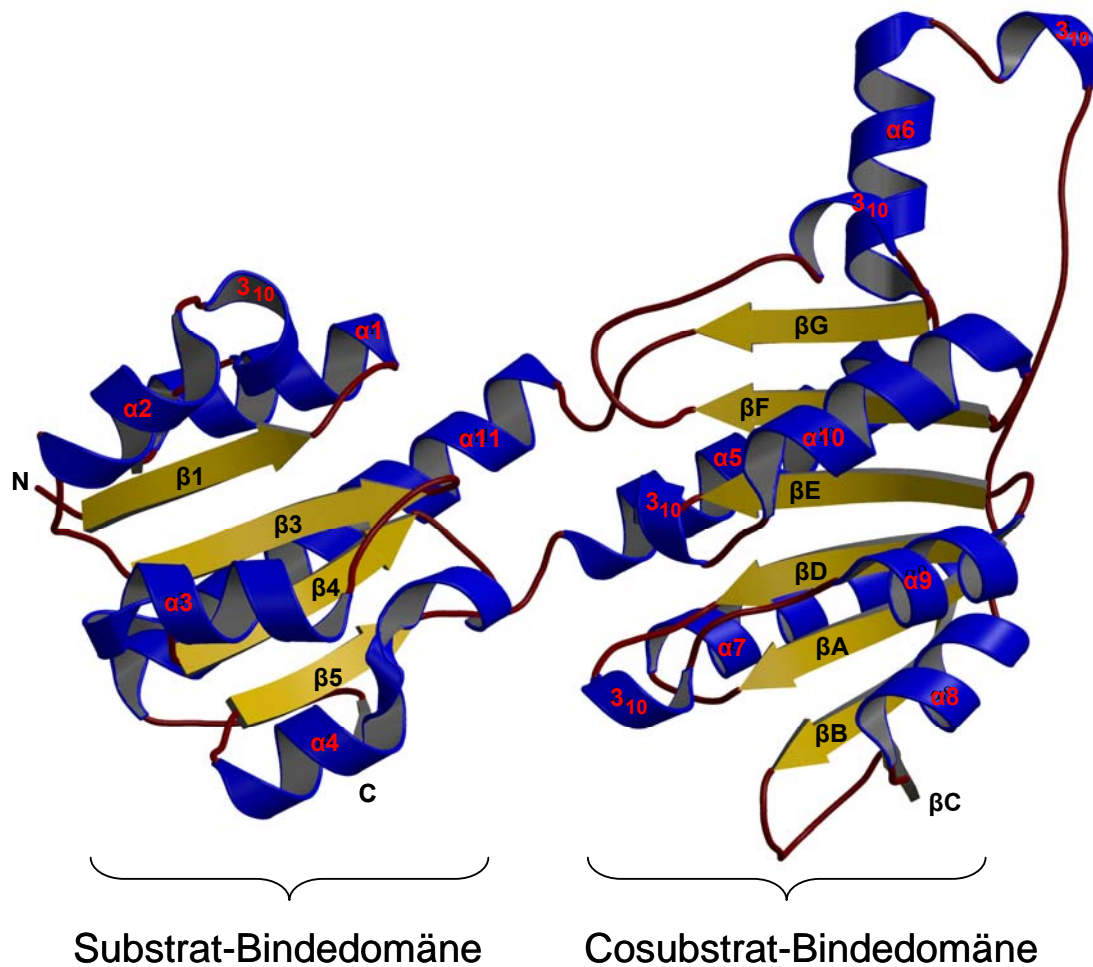


Abb. 53b: H(P)PR-Monomer in der asymmetrischen Einheit. Die distale Seite zeigt nach vorne.

17.3.1 NADP⁺-Bindung in der Komplexstruktur

Die Komplexstruktur enthält in beiden Monomeren ein Cosubstrat-Molekül, welches durch die Dichte sehr gut definiert ist (siehe Abbildung 54).

Das NADP⁺ ist an die Cosubstrat-Bindedomäne mit insgesamt 16 Wasserstoffbrücken gebunden, berechnet mit dem Programm Contacsym (Sheriff et al., 1987). Dabei geht das NADP⁺ sowohl Wechselwirkungen mit der Protein-Hauptkette als auch mit Seitenketten ein. Die Carboxamid-Gruppe bildet 3 Wasserstoffbrücken zum Protein (N41 - Asp256 OD2 3,0 Å, N41-Ile230 O 3,1 Å, O40 - His279 NE2 3,2 Å). Normalerweise ist die Carboxamid-Gruppe in NADP⁺ parallel zum Pyridin-Ring ausgerichtet. Die vorliegenden Wechselwirkungen bewirken jedoch, dass sich die Carboxamid-Gruppe mit einem Winkel von 31° aus der Pyridin-Ebene dreht. Diese Drehung ist deutlich in der Dichte zu erkennen.

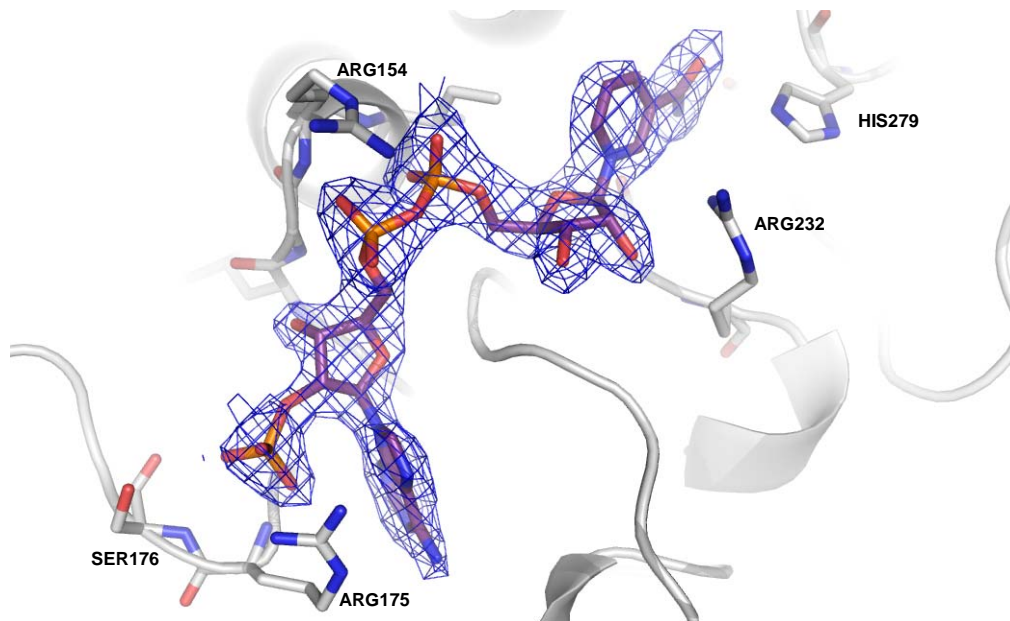


Abb. 54: 3Fo-2Fc Elektronendichte um das Cosubstrat, Darstellung mit dem Programm Pymol bei 1,5 Sigma.

Die Phosphat-Gruppe des Cosubstrates bildet insgesamt fünf Wasserstoffbrücken zu den beiden Aminosäuren Arg175 und Ser176. Eine Übersicht der H-Brücken ist in Abbildung 55 wiedergegeben.

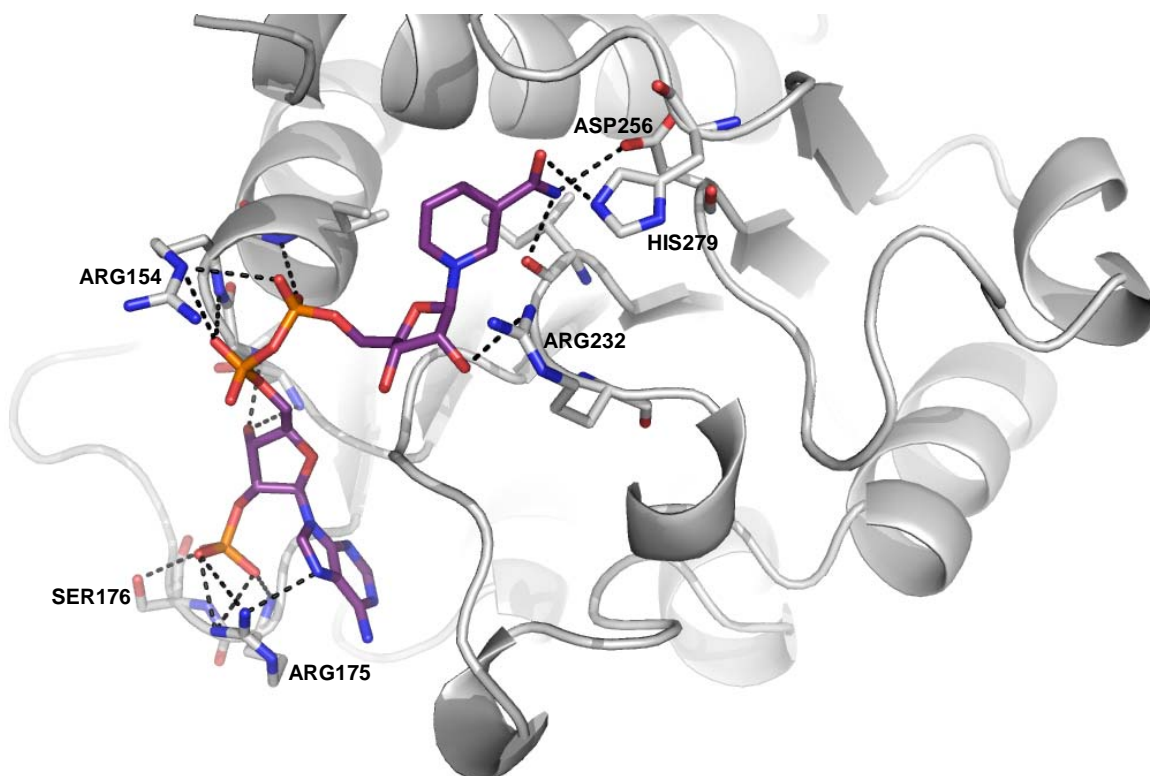


Abb. 55: Wasserstoffbrücken des NADP⁺-Moleküls zum Protein.

17.3.2 Dimer-Bildung

Durch kristallographische Symmetrioperationen kann das Dimer der H(P)PR erzeugt werden. Die beiden Monomere lagern sich im Bereich der Cosubstrat-Bindedomäne, dort wo die Schleife aus dem Protein herausragt, zusammen (Abbildung 56). Mit dem Programm MS wurde die vergrabene Oberfläche berechnet. Sie beträgt bei der nativen Struktur pro Monomer 2141 Å². Davon sind 2025 Å² (94%) von der Cosubstrat-Bindedomäne und nur 116 Å² (5,5%) von der Substrat-Bindedomäne.

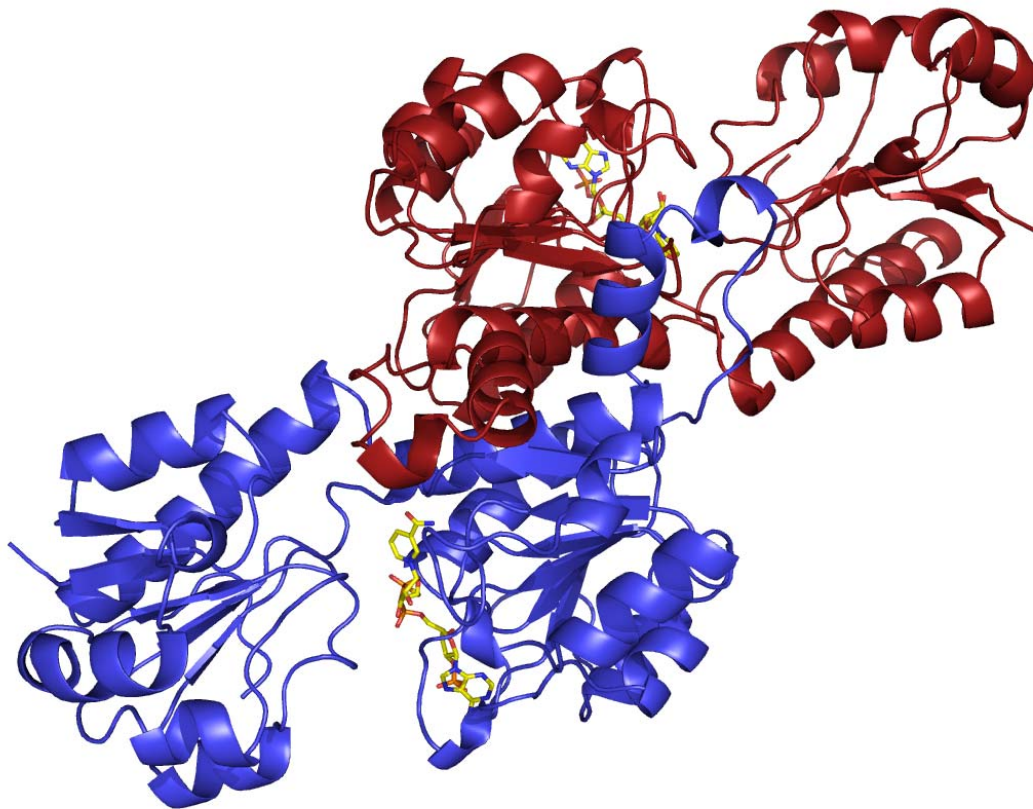


Abb. 56: Dimer der H(P)PR mit gebundenem NADP⁺ (gelb dargestellt).

18 Docking von möglichen Substratstrukturen

Für das Docking wurde die Komplexstruktur verwendet. Mit dem Programm Autodock (Morris et al., 1998) wurden fünf verschiedene Substrate (siehe Tabelle 5) in die katalytische Spalte eingepasst (vergleiche 13.5).

Für jedes Substrat wurden 100 Positionen ermittelt und in Gruppen nach ihrer Geometrie und Energie zusammengefasst. Dabei traten generell zwei unterschiedliche Bindungsmodi auf, die in Abbildung 57 dargestellt sind. Im einen Bindungsmodus orientiert sich das Substrat mit

einem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe und mit dem Sauerstoff der Carbonylgruppe zum Arg232 hin (Bindungsmodus A), im anderen treten beide Sauerstoffatome der Carboxylgruppe mit dem Arg232 in Wechselwirkung (Bindungsmodus B). Dabei ist zu beachten, dass beim Bindungsmodus A das D-(R)-Isomer gebildet werden würde, während bei der anderen Orientierung das L-(S)-Isomer entstehen würde.

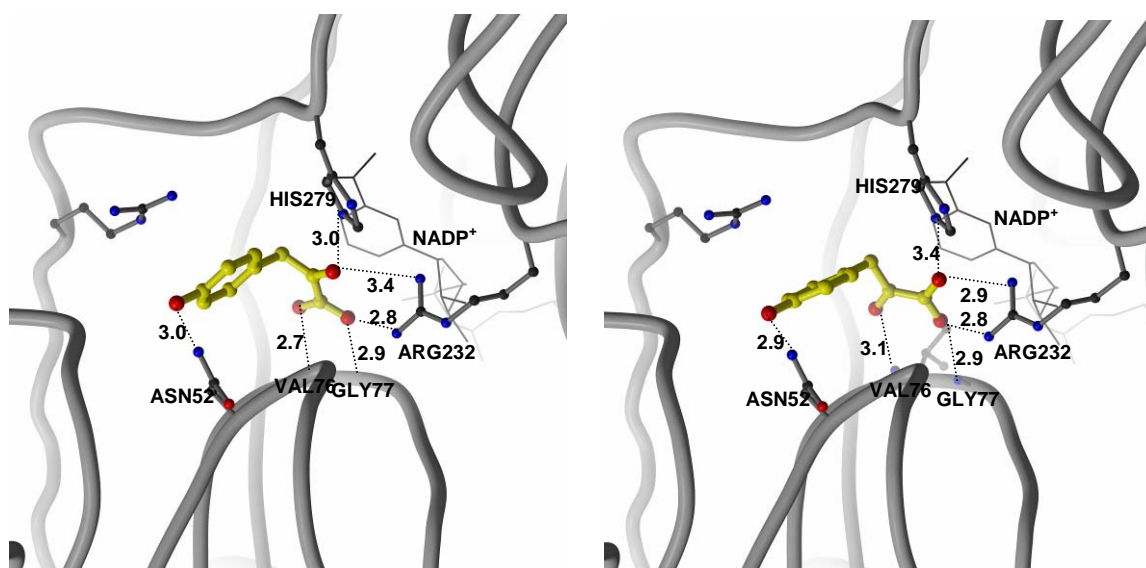


Abb. 57: Bindungsmodus A (links) und Bindungsmodus B (rechts) für das Substrat pHPP.

Einen Überblick über die zusammengefassten Gruppen und die aufgetretenen Bindungsmodi gibt Tabelle 5. Für die einzelnen Substrate sind die Größe und der Rang der Cluster-Gruppen sowie die niedrigste Docking-Energie der Gruppe angegeben. Ebenfalls aufgeführt ist der Bindungsmodus mit der Anzahl an Individuen und die resultierende Stereochemie. Der B* Bindungsmodus ist ein abgewandelter B-Modus.

Substrat	Gruppe Rang/Größe	niedrigste Docking- Energie [kcal/mol]	Bindungs- modus	Anzahl Individuen	Stereo- chemie
pHPP	1 / 95	-9,39	B	57	S
		-9,35	A	38	R
	2 / 3	-8,91	B*	3	R
DHPP	1 / 7	-9,92	A	6	R
	2 / 42	-9,87	B	38	S
		-9,58	A	4	R
	3 / 33	-9,63	A	32	R
		-9,29	B	1	S
	4 / 6	-9,59	A	6	R
PP	1 / 95	-8,89	A	49	R
		-8,87	B	46	S
	2 / 5	-8,84	B	5	S
HP	1 / 60	-6,48	A	48	R
		-6,36	B	12	S
	2 / 29	-6,40	A	18	R
		-6,31	B	11	S
	3 / 8	-6,26	B*	8	R,S
Pyruvat	1 / 97	-5,91	A	90	R
		-5,75	B	7	S
	2 / 3	-5,70	B*	3	R

Tabelle 5: Übersicht über die Dockingergebnisse für fünf Substrate (pHPP = 4-Hydroxyphenylpyruvat, DHPP = 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat, PP = Phenylpyruvat, HP = Hydroxypyruvat, Pyruvat).

IV Diskussion

19 Sequenzen

19.1 Sequenzvergleich der H(P)PR

Die von K. H. Kim aus Zellkulturen von *Coleus blumei* isolierte cDNA der H(P)PR, von der eine Beteiligung an der Rosmarinsäure-Biosynthese postuliert wurde, zeigt nach Datenbankvergleichen hohe Ähnlichkeiten zu anderen cDNA-Sequenzen aus Pflanzen, von denen allerdings meist keine Funktion nachgewiesen wurde. Die höchste Identität auf Nukleotidebene liegt bei einer erst kürzlich deponierten putativen Hydroxyphenylpyruvat Reduktase aus *Salvia miltiorrhiza* (Chinesischer Salbei oder Rotwurzelsalbei, 87,71%) vor. Da hier keine enzymatische Aktivität bestimmt wurde, ist anzunehmen, dass die Benennung nur auf Grund der Ähnlichkeit zu der von Kim et al. (2004) isolierten Gensequenz aus *Coleus blumei* erfolgte. Diese Pflanze gehört wie *Coleus blumei* zu der Familie der Lamiaceae und enthält ebenfalls Rosmarinsäure als sekundären Pflanzenmetabolit. Homologe cDNAs mit geringeren Identitäten stammen aus Pflanzen wie *Lycopersicon esculentum* (Tomate, 72,93%), *Lotus corniculatus* var. *japo* (Lotus, 69,87%) oder *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand, 68,15%). Diese Pflanzen gehören unterschiedlichen Pflanzenfamilien an, und bislang wurde in ihnen keine Rosmarinsäure nachgewiesen. Dies wirft die Frage auf, warum in Pflanzen, die keine Rosmarinsäure bilden, homologe Proteine vorkommen und welche Funktion sie dort haben sollten. Andererseits könnte in Frage gestellt werden, ob das als HPPR klonierte Gen tatsächlich als spezifische HPPR fungiert.

19.2 Neue cDNA-Sequenzen aus Solanaceen

Um mehr über die homologen Proteine in Erfahrung zu bringen, wurde zunächst die zur Zeit der Durchführung der Experimente ähnlichste cDNA aus *Arabidopsis thaliana* kloniert, exprimiert und im Rahmen einer Diplomarbeit charakterisiert. Das heterolog exprimierte Protein akzeptierte sowohl pHPP und DHPP als auch Substrate ohne aromatischen Ring. Daneben konnten zwei neue Sequenzen aus Aubergine (*Solanum melongena*) und Paprika (*Capsicum annuum*), beides Solanaceen, gefunden werden. Diese Proteine zeigen 83,39% (Aubergine) bzw. 83,07% Identität (Paprika) zu der Aminosäuresequenz der H(P)PR aus *Coleus blumei*. Da in diesen beiden Pflanzen kein Vorkommen an Rosmarinsäure als Inhaltsstoff bekannt ist, bestärkte dies die Frage nach der Funktion dieser Proteine.

19.3 H(P)PR-Sequenzen aus *Coleus blumei* Pflanzen

Die cDNA der H(P)PR wurde aus einer *Coleus blumei* Zellkultur isoliert, die bereits über 20 Jahre alt war (mündliche Mitteilung von M. Petersen). Um bei der Nukleotidsequenz sicher zu gehen, dass in dieser Zeit keine Mutationen stattgefunden hatten, wurde aus zwei *C. blumei* Pflanzen (*Coleus* M und *Coleus* V6) das H(P)PR-Gen kloniert und sequenziert. Die Sequenz aus *Coleus* M zeigt nur an einer Stelle eine Abweichung in der Basenfolge, die in einer anderen Aminosäure resultiert (Austausch von Cys10 durch ein Serin). Die Sequenz der *Coleus* V6 entspricht, soweit sie sequenziert wurde, der H(P)PR-Sequenz aus der *Coleus* Zellkultur. Durch Klonierung der H(P)PR aus Pflanzen konnte demnach die Sequenz aus der *C. blumei* Zellkultur bestätigt werden. Bei der Abweichung in einer Base in der cDNA aus *Coleus* M wird von einer Variabilität dieser Pflanze ausgegangen, insbesondere da sich an dieser Stelle in der *Coleus* V6-cDNA die gleiche Base wie in der Zellkultur-cDNA befindet.

20 Charakterisierung der heterolog exprimierten H(P)PR

20.1 Proteinaufreinigung und Qualität der Proteinchargen

Durch den über den pET-15b-Vektor eingeführten N-terminalen His-Tag konnte das H(P)PR-Protein gut in für die Enzymcharakterisierung ausreichender Reinheit und in genügender Menge über Metallchelate-Chromatographie aufgereinigt werden. Für die Kristallisation des nativen Proteins musste zusätzlich eine anschließende Aufreinigung über eine 2'5'-ADP-Sepharose Säule durchgeführt werden.

Das für die Charakterisierung eingesetzte Protein enthielt noch die zusätzlichen Aminosäuren des His-Tags und der Thrombin-Schnittstelle (Insgesamt 16 AS). Ein Vergleich zweier Proteinchargen mit N-terminalem His-Tag zeigte im Vergleich zu His-Tag-freiem Protein eine etwas geringere Aktivität (17,6 bzw. 27,2% niedriger, je nach eingesetzter Charge). Dieser Aktivitätsunterschied könnte eine Variabilität in der Proteincharge sein, betrachtet man die 9,6%ige Abweichung der beiden Enzymchargen mit N-terminalen His-Tag. Im Vergleich dazu fällt die Aktivität des Proteins mit C-terminalem His-Tag mit 48% der Aktivität des His-Tag-freien Proteins deutlich niedriger aus. Greift man auf Informationen aus der Kristallstruktur zurück, so lässt sich feststellen, dass für den N-terminalen His-Tag keine Dichte beobachtet werden konnte. Dies lässt auf einen sehr flexiblen Bereich schließen, d.h. dass der N-terminale His-Tag keine stabilen Wechselwirkungen mit dem restlichen Protein

eingeht und dadurch die Faltung des Proteins nicht beeinflussen sollte. Der N-Terminus befindet sich nicht in der Nähe des aktiven Zentrums, so dass auch hier keine Beeinflussung der Katalyse zu erwarten wäre. Der C-Terminus dagegen liegt am Rande der katalytischen Spalte, so dass ein angehängter His-Tag in diese hineinragen und damit die katalytische Aktivität negativ beeinflussen könnte. Um genauere Aussagen über die Beeinflussung durch den C-terminalen His-Tag treffen zu können, müsste das H(P)PR-Protein mit C-terminalem His-Tag allerdings kristallisiert und weiter charakterisiert werden. Da keine deutliche Beeinflussung der Enzymaktivität durch den N-terminalen His-Tag festgestellt wurde, scheint eine Verwendung dieses Proteins für die Enzym-Charakterisierung gerechtfertigt zu sein.

20.2 pH- und Temperaturabhängigkeit

Das pH-Optimum der H(P)PR wurde sowohl in unterschiedlichen Puffern (N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropansulfonsäure, Tris/HCl-Puffer, Kaliumphosphatpuffer, 2-Morpholino- β -ethansulfonsäure), als auch bei der Verwendung des Britton-Robinson-Puffers bei pH 7,0 ermittelt. Dies entspricht den Werten des nativen Enzyms, dessen optimaler pH-Wert bei 6,5 – 7,0 liegt (Häusler et al., 1991). Der optimale Temperaturbereich dagegen liegt bei dem heterolog exprimierten Enzym mit (40 – 55°C) höher als bei dem nativen Enzym (35 – 37°C). Es ist auffällig, dass bei dem heterolog exprimierten Enzym ein recht breites Temperaturoptimum bei ebenfalls recht hohen Temperaturen vorliegt. Da es sich bei *Coleus blumei* um eine Pflanze tropischen Ursprungs handelt, könnten solche hohen Temperaturoptima erklärbar sein. Dagegen stellt sich die Frage, warum ein Unterschied im Temperaturoptimum des nativen und des heterolog exprimierten Enzyms beobachtet wurde. Dies könnte daran liegen, dass bei der Charakterisierung der nativen HPPR eine Enzymmischung verwendet wurde, bei der Kreuzreaktionen anderer in der Mischung vorhandener Enzyme zu Beeinflussungen führen könnten. Weiterhin könnten in der nativen Enzymmischung Proteasen (proteinspaltende Enzyme) vorliegen, die bei höheren Temperaturen stärker aktiv sind und demnach Enzyme, einschließlich der HPPR, inaktivieren.

20.3 Substratspezifität

Bei der Vermessung einiger Substrate traten Probleme bezüglich der Detektierbarkeit und der damit zusammenhängenden Genauigkeit auf. Enzymtests, die mittels HPLC ausgewertet wurden, bereiteten bei großen Substratkonzentrationen Schwierigkeiten, da der Substratpeak so groß war, dass kleinere Peaks nicht mehr erkennbar waren. Dies führte dazu, dass der Sättigungsbereich bei der Bestimmung des K_m -Wertes von pHPP nicht erreicht werden konnte.

Bei der Enzymtest-Auswertung mittels Photometer dagegen musste festgestellt werden, dass nicht nur der Cofaktor sondern auch die meisten Substrate bei 340 nm absorbierten, was eine Auswertung unmöglich machte. Daher wurde eine Wellenlänge von 380 nm gewählt, bei der die Substrate die Messung weniger beeinflussten aber auch die Detektion des Cosubstrates weniger sensitiv war. Obwohl also gewisse Probleme und daraus resultierende Messungenauigkeiten auftraten, soll dennoch versucht werden, die mittels HPLC oder Photometer erhaltenen apparenten K_m -Werte miteinander zu vergleichen.

20.3.1 Cosubstrat

Zunächst sollen die beiden getesteten Cosubstrate NADH und NADPH, deren apparente K_m -Werte mittels Photometer mit Pyruvat als Substrat ermittelt wurden, betrachtet werden (vergleiche 16.3.2). Für NADH ergab sich ein apparenter K_m -Wert von 500 μM wohingegen der apparente K_m -Wert für NADPH mit 20 μM deutlich niedriger liegt. Die spezifischen Aktivitäten liegen mit NADPH als Cosubstrat höher als mit NADH. Dies lässt vermuten, dass NADPH das native Cosubstrat der HPPR ist, aber auch NADH akzeptiert wird.

Diese Cosubstrat-Präferenz entspricht der von Häusler et al. (1991) charakterisierten nativen HPPR aus *Coleus blumei* Zellkulturen. Häusler reinigte das Enzym aus *Coleus blumei* Zellkulturen mittels Ammoniumsulfatfällung auf. Bei der Charakterisierung ergab sich ein apparenter K_m -Wert für NADPH von 95 μM und für NADH von 190 μM . Beide Cosubstrate wurden von der nativen HPPR akzeptiert, jedoch lag die Aktivität des Enzyms mit NADPH als Cosubstrat bei nur 30% der Enzymaktivität mit NADH.

Diese Abweichungen im K_m -Wert zwischen nativen und kloniertem Enzym könnten daran liegen, dass es sich bei dem von Häusler verwendeten Enzym um eine Enzymmischung gehandelt hat und nicht um ein Reinenzym, was eine Charakterisierung generell schwierig macht. Dennoch geht Häusler davon aus, dass NADPH das natürliche Cosubstrat der HPPR ist, was auch für das heterolog exprimierte Enzym bestätigt werden konnte.

20.3.2 Substrat

Verschiedene Derivate des Pyruvats und Phenylpyruvats wurden auf Umwandlung zum entsprechenden Laktat hin getestet. Die H(P)PR akzeptierte alle ihr angebotenen Substrate. Abbildung 34 auf Seite 79 gibt einen Überblick über die chemischen Strukturen der getesteten Substanzen.

Bei den Umsetzungen konnten unterschiedliche Akzeptanzen der Substrate festgestellt werden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die getesteten Substrate mit den jeweiligen

ermittelten apparenten K_m -Werten. Von DHPP konnte kein apparenter K_m -Wert bestimmt werden, da nicht genügend Substanz verfügbar war.

Es konnte gezeigt werden, dass pHPP, das als das native Substrat der HPPR angenommen wird, von der heterolog exprimierten H(P)PR mit einem apparenten K_m -Wert von 16,6 mM umgesetzt wird. Dieser Wert liegt allerdings für ein natives Substrat recht hoch, betrachtet man vor allem die für die native HPPR ermittelten apparenten K_m -Werte für pHPP von 10 μ M (Häusler et al., 1991) bzw. 80 μ M (Meinhard et al., 1992). Dies würde bedeuten, dass das klonierte Enzym pHPP um etwa 200-1600-fach schlechter akzeptiert. Für das native Enzym wurde pHPP als das am besten umgesetzte Substrat identifiziert. Für das heterolog exprimierte Enzym allerdings konnten bessere Substrate festgestellt werden. Die am besten umgesetzte Substanz scheint Hydroxypyruvat mit einem apparenten K_m -Wert von 1 mM zu sein, gefolgt von Glyoxylat mit 2 mM. Dabei sei zu vermerken, dass bei Hydroxypyruvat als einzigem getesteten Substrat eine Substrathemmung beobachtet wurde.

Substrat	Methodik	Cosubstrat	Apparenter K_m -Wert	Rel. Umsatz bezogen auf DHPP
pHPP	HPLC	NADPH	16,6 mM	
pHPP	Photometer Punktmessung	NADPH		52,3%
HMPP	Photometer Punktmessung	NADPH		22,7%
DHPP	Photometer Punktmessung	NADPH		100%
PP	Photometer Punktmessung	NADPH		1%
Pyruvat	Photometer	NADPH	25 mM	
Glyoxylat	Photometer	NADPH	2 mM	
HP	Photometer	NADPH	1 mM Substrathemmung	
OIC	Photometer	NADPH	50 mM	

Tabelle 6: Apparente K_m -Werte der getesteten Substrate der H(P)PR. pHPP: 4-Hydroxyphenylpyruvat, HMPP: 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpyruvat, DHPP: 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat, PP: Phenylpyruvat, HP: Hydroxypyruvat, OIC: Oxoisocaproat.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist die Akzeptanz von Phenylpyruvat. Während das native Enzym Phenylpyruvat absolut nicht umsetzen konnte (Häusler et al., 1991), wurde diese Substanz von der heterolog exprimierten H(P)PR, wenn auch schlecht, als Substrat akzeptiert (mit etwa 2% der Aktivität von pHPP). Der Umsatz von Phenylpyruvat war allerdings sehr gering, so dass es sein könnte, dass bei der Charakterisierung der nativen HPPR ein Umsatz aufgrund der geringen Mengen nicht detektierbar war und daher angenommen wurde, dass das Substrat nicht akzeptiert wurde. Ebenfalls sollte man beachten, dass bei der heterolog exprimierten H(P)PR wesentlich größere Enzymmengen eingesetzt werden konnten, da das Enzym als Reinenzym vorlag, wohingegen bei dem nativen Enzym eine Enzymmischung mit ungewissem Anteil an nativer HPPR eingesetzt wurde.

Insgesamt wurden also Unterschiede in der Substratspezifität zwischen nativer und heterolog exprimierter HPPR festgestellt, die Zweifel aufkommen lassen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit charakterisierten Enzym wirklich um die HPPR handelt, auch wenn die Umsetzung von pHPP zu pHPL von dem klonierten Enzym katalysiert wird.

20.4 Struktur der H(P)PR

20.4.1 Allgemeiner Aufbau

Das H(P)PR-Protein konnte, wie unter 17.1 beschrieben, kristallisiert und die Struktur bestimmt werden. Es wurden zwei Strukturen bestimmt, eine native Proteinstruktur, die nur das Protein ohne Substrat und Cosubstrat enthält. Die Auflösung lag bei 1,47 Å mit P3₁21 als Raumgruppe. Dieser Datensatz konnte bis zu einem R_{cryst} -Wert von 14,1% und einem R_{free} -Wert von 19,2% verfeinert werden. Ein zweiter Datensatz, der das Protein mit NADP⁺ gebunden enthält, konnte mit einer Auflösung von 2,2 Å prozessiert werden. Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe P4₁2₁2 und wurde bis zu einem R_{cryst} -Wert von 19,3% und einem R_{free} -Wert von 23,5% verfeinert. Weitere kristallographische Daten zu beiden Strukturen befinden sich in Tabelle 4 auf S. 97.

Zur Bestimmung der nativen Struktur wurde ein Modell aus drei verschiedenen D-Isomerspezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen mit dem Programm Swiss-Model erstellt (Schwede et al., 2003), das daraufhin als Suchmodell für den molekularen Ersatz mit dem Programm Phaser diente. Die native Struktur wurde für den zweiten Datensatz zur Berechnung der Phasen verwendet (siehe 17.2).

Die H(P)PR zeigt einen für die Proteinfamilie der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen typischen Aufbau mit zwei Domänen mit dazwischen liegender katalytischer Spalte. Die ersten 100 AS bilden zusammen mit den AS 285 – 313 die Substrat-Bindedomäne. Diese Domäne bindet das Substrat und stellt die kleinere der beiden Domänen dar. Die andere Domäne wird als Cosubstrat-Bindedomäne bezeichnet und setzt sich aus den AS 101 – 284 zusammen. Einige Aminosäuren dieser Domäne bilden eine Schlaufe, die von dem Protein absteht und bei der Dimerisierung eine Rolle spielt. Eine Darstellung der H(P)PR-Struktur ist in Abbildung 58 wiedergegeben. Ein Topologie-Diagramm zur Übersicht des Protein-Aufbaus ist in Abb. 53a auf Seite 98 dargestellt.

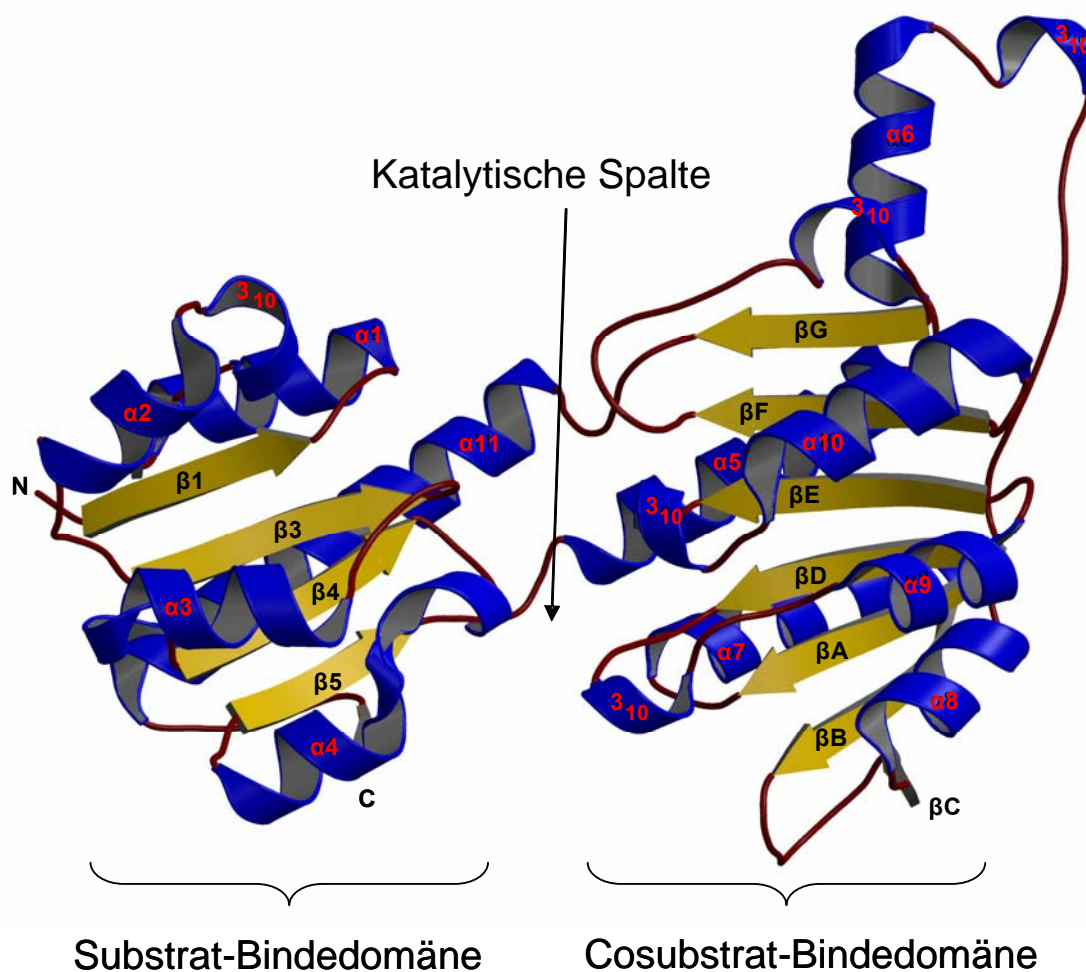


Abb. 58: Struktureller Aufbau der H(P)PR.

Diese Zwei-Domänen-Struktur findet sich bei fast allen Vertretern der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen Familie. Die D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase (PDB code: 1psd) und die Erythronat-4-Phosphat Dehydrogenase (PDB code: 2o4c) bilden eine

Ausnahme, da diese Enzyme eine dritte Domäne enthalten (Schuller et al., 1995; Ha et al., 2007).

Das Protein mit der der H(P)PR ähnlichsten Struktur ist die humane Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase (PDB code: 2gcg) (Booth et al., 2006), gefolgt von der D-Glycerat Dehydrogenase aus *Hyphomicrobium methylovorum* (PDB code: 1gdh) (Goldberg et al., 1994). Zur Überprüfung der strukturellen Ähnlichkeiten wurde das Programm Dali verwendet (Holm und Park, 2000), das jeweils zwei Strukturen bestmöglich überlagert und dabei die intramolekularen Abstände auswertet. Als Resultat wird ein Übereinstimmungs-Wert berechnet (z-score oder z-Wert). Ab einem z-Wert von 2 sind strukturelle Ähnlichkeiten signifikant. Dabei ist der z-Wert auch von der Größe der verglichenen Strukturen abhängig. Beim Vergleich der Strukturen der H(P)PR mit der Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase (PDB code: 2gcg) errechnete sich ein z-Wert von 35,3. Bei der D-Glycerat Dehydrogenase-Struktur (PDB code: 1gdh) ergab sich ein z-Wert von 32,2. Beide Werte lassen auf sehr hohe strukturelle Ähnlichkeiten schließen.

Um die verschiedenen Domänen-Öffnungswinkel der verfügbaren Strukturen der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen nivellieren zu können, wurden die Proteine in die Substrat-Bindedomäne und die Cosubstrat-Bindedomäne unterteilt und separat verglichen. Die jeweiligen Aufteilungen sind in Tabelle 7 angegeben. Auch bei diesem Vergleich ergaben die Strukturen der Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase (PDB code: 2gcg) und der D-Glycerat Dehydrogenase (PDB code: 1gdh) die höchsten Homologien. Eine Überlagerung von allen verglichenen Strukturen (getrennt in die beiden Domänen) und ein Vergleich mit den zwei strukturell ähnlichsten Proteinen Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase (PDB code: 2gcg) und D-Glycerat Dehydrogenase (PDB code: 1gdh) sind in Abbildung 59 veranschaulicht.

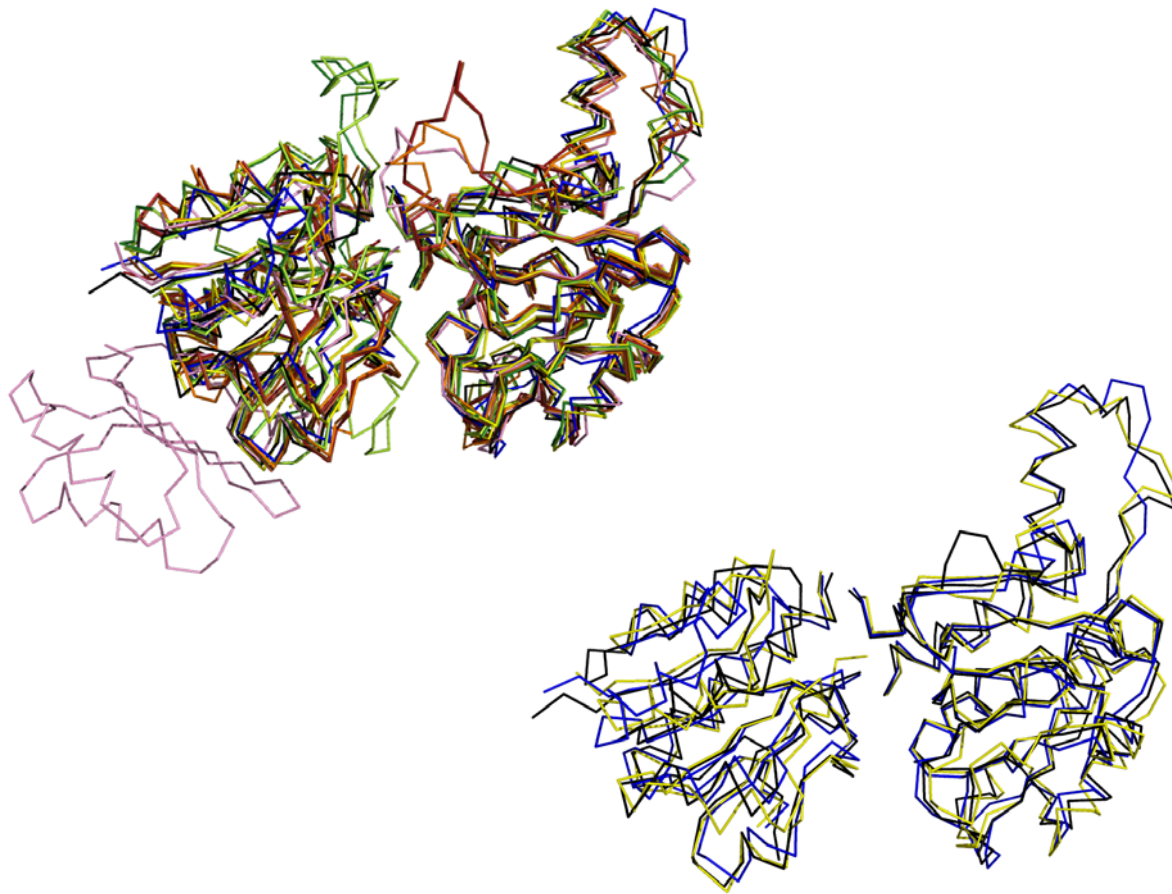


Abb. 59: Überlagerung der H(P)PR mit verwandten Strukturen, getrennt in beide Domänen. Die Positionierung wurde mit dem Programm Dali errechnet. Im oberen Bild sind die C-alpha-Atome (Protein-Grundgerüst) der einzelnen Aminosäuren aller verglichenen Strukturen abgebildet. In der unteren Darstellung nur die beiden mit dem höchsten z-Wert: 2gcg und 1gdh. Darstellungen: H(P)PR blau, Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase (2gcg) schwarz, D-Glycerat Dehydrogenase (1gdh) gelb, NAD-abhängige Formiat Dehydrogenase (2nad) hellgrün, NAD-abhängige Formiat Dehydrogenase (2nac) dunkelgrün, D-Laktat Dehydrogenase (1j49_A) dunkelrot, D-Laktat Dehydrogenase (1j49_B) braun, D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase (1psd) lila, D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase (1dxy) orange.

Wie man aus den Strukturüberlagerungen erkennen kann, sind die Cosubstrat-Bindedomänen generell ähnlicher als die Substrat-Bindedomänen. Dieser stark konservierte Aufbau der Cosubstrat-Bindedomänen lässt auf einen hohen Selektionsdruck während der Evolution schließen. Dengler et al. (1997) sehen die starke Einbeziehung der Domäne in der Cosubstratbindung als auch in der Dimerisierung als Grund für geringere Möglichkeiten für evolutionäre Veränderungen.

Struktur (PDB Code)	Gesamtstruktur	Substratbinde- Domäne	Cosubstratbinde- Domäne	AS Einteilung Cosubstratbindedomäne
2gcg	35,3	17,2	27,6	108-298
1gdh	32,2	17,0	28,1	102-292
1J49_A	28,6	13,0	26,4	104-302
1J49_B	31,8	12,7	26,4	104-302
1psd	28,6	16,5	26,0	109-297
1dxy	29,5	13,0	26,6	102-300
2nac	31,6	12,9	26,2	147-337
2nad	31,1	12,2	26,1	147-337

Tabelle 7: Errechnete z-Werte mit dem Programm Dali (Holm und Park, 2000) zum strukturellen Vergleich der H(P)PR mit verwandten Proteinen. Die Einteilung der Cosubstrat-Bindedomänen ist jeweils angegeben; die Substrat-Bindedomäne besteht entsprechend aus den restlichen AS.

2gcg: Glyoxylat Reduktase/Hydroxypyruvat Reduktase, Booth et al., 2006; **1gdh**: D-Glycerat Dehydrogenase, Goldberg et al., 1994; **1J49**: Kette A und B von D-Laktat Dehydrogenase, Razeto et al., 2002; **1psd**: D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, Schuller et al., 1995; **1dxy**: D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase, Dengler et al., 1997; **2nac**, **2nad**: NAD-abhängige Formiat Dehydrogenase, Lamzin et al., 1994.

20.4.2 Domänenbewegung und Katalyse

Von mehreren D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen wurde berichtet, dass die beiden Domänen flexibel sind und sich zur Katalyse aneinander annähern (Lamzin et al., 1994; Schuller et al., 1995; Stoll et al., 1996). Nach erfolgter Katalyse öffnet sich die Spalte zwischen den Domänen wieder und lässt Produkt und umgewandeltes Cosubstrat frei. Diese Flexibilität wird durch zwei Helices gewährleistet, die die beiden Domänen miteinander verbinden. Diese Helices dienen als Drehpunkt und geben dem Protein die Möglichkeit, eine Kippbewegung auszuführen. Die offene Konformation wird dabei als Apo-Form und die geschlossene Form als Holo-Form bezeichnet. Von einigen Proteinen wurde berichtet, dass die Annäherung der beiden Domänen nach Bindung des Cosubstrates erfolgt (Lamzin et al., 1994; Booth et al., 2006), wohingegen an anderer Stelle berichtet wurde, dass zusätzlich Substrat in der katalytischen Spalte binden muss, um durch weitere Wechselwirkungen den Schließmechanismus auszulösen und die geschlossene Konformation zu stabilisieren (Razeto et al., 2002). Eine Ausnahme dieser beiden Theorien stellt die D-HicDH dar, die, obwohl Substrat und Cosubstrat in der katalytischen Spalte gebunden vorliegen, in der offenen Konformation kristallisiert. Dengler et al. (1997) sahen einen Grund hierfür in einer möglichen Beeinflussung der Konformation durch die kristalline Umgebung. Da im

Proteinkristall ein Protein anderen Wechselwirkungen aus der Umgebung ausgesetzt ist, als ein Protein in Lösung, könnte dies Auswirkungen auf die Konformation eines Proteins haben. Zwischen der nativen H(P)PR-Struktur und der NADP⁺-Komplexstruktur konnte keine signifikante Veränderung im Öffnungswinkel zwischen den beiden Domänen festgestellt werden. Die einzige Veränderung ist eine leichte Drehbewegung der Substratdomäne in Richtung der proximalen Seite des Proteins hin. Der resultierende Winkel liegt bei 4,4° mit den Drehpunkten bei den Aminosäuren 100-101, 204-209 und 290-291. Zur Berechnung dieser Bewegung wurde das Programm Dyndom verwendet (Hayward et al., 1997; Hayward und Berendsen, 1998). Interessanterweise scheint diese Bewegung keine signifikante Auswirkung auf die katalytische Region zu haben. Es wurden vielmehr Veränderungen der Helices am Rande der Substrat-Bindedomäne beobachtet. Ein struktureller Vergleich der beiden H(P)PR Strukturen ist in Abbildung 60 dargestellt.

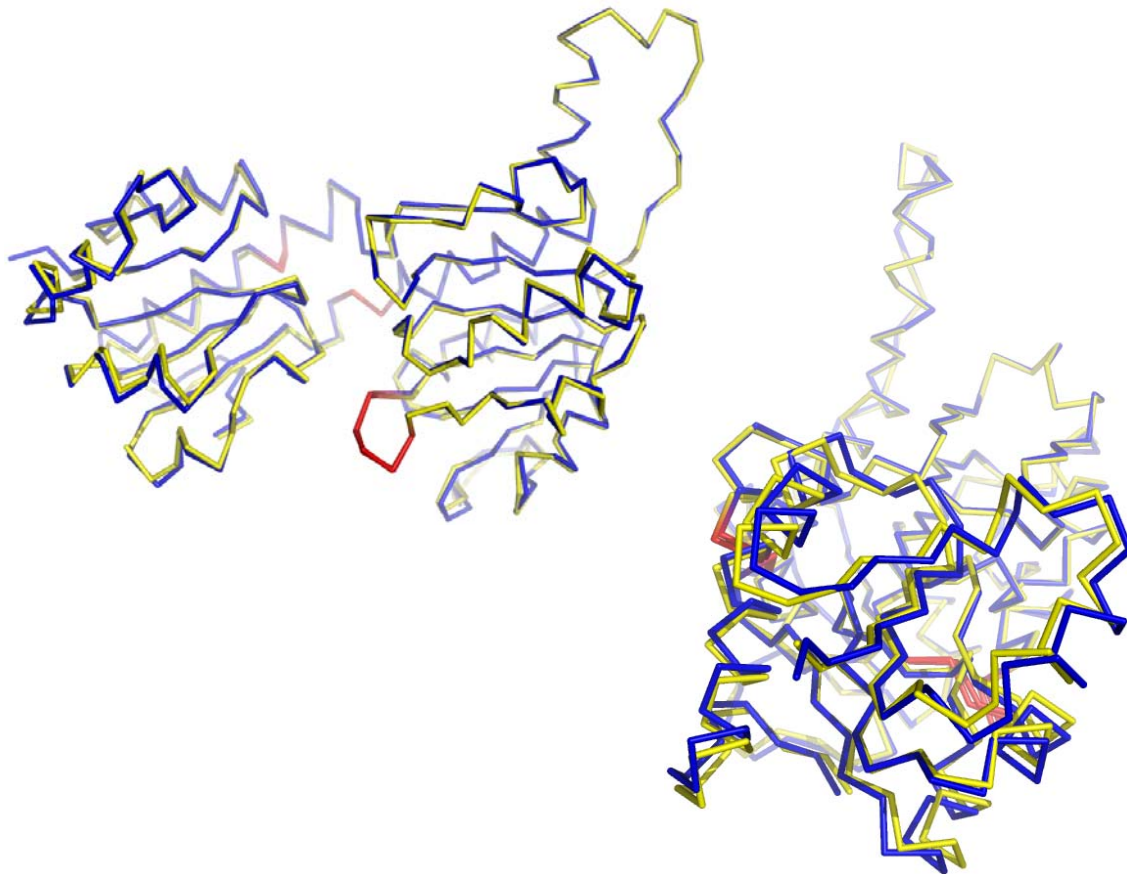


Abb. 60: Überlagerung der nativen H(P)PR-Struktur (dunkelblau) mit der H(P)PR-Komplex-Struktur (gelb). Die von dem Programm Dyndom errechneten Drehpunkte sind in rot dargestellt. Die obere Darstellung lässt kaum Unterschiede im Domänen-Öffnungswinkel erkennen. Die untere Sicht auf die Substrat-Bindedomäne zeigt eine leichte Drehbewegung der Komplexstruktur gegen den Uhrzeigersinn.

Eine Überlagerung der beiden H(P)PR-Strukturen mit anderen verwandten Proteinen lässt vermuten, dass beide Strukturen in der geschlossenen Konformation vorliegen. Dabei wurden die Cosubstrat-Bindedomänen übereinander gelegt und die unterschiedlichen Positionen der Substrat-Bindedomänen ausgewertet. Der Öffnungswinkel der H(P)PR-Proteine ist vergleichbar mit den Holo-Strukturen von D-LDH (1J49_B; Razeto et al., 2002), FDH (2nac; Lamzin et al., 1994) und GR/HPR (2gcg; Booth et al., 2006).

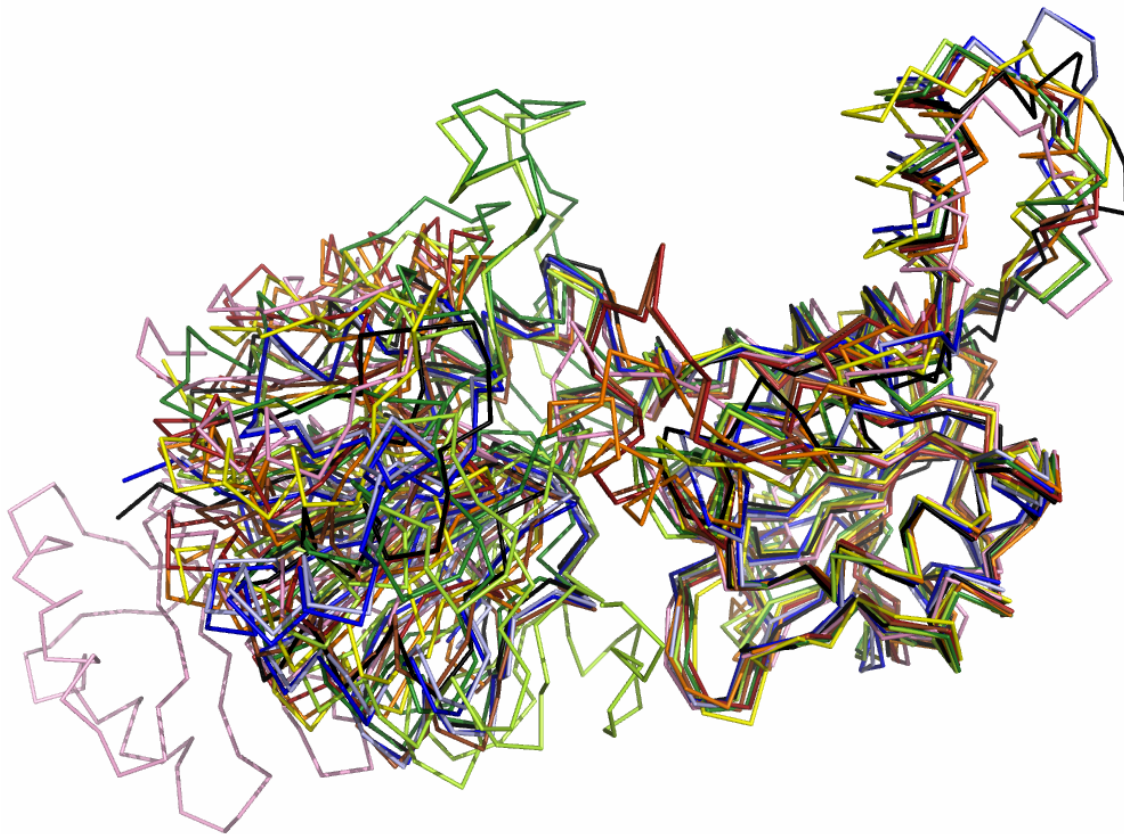


Abb. 61: Überlagerung der Cosubstrat-Bindedomänen verwandter D-Isomer-spezifischer 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen. Darstellungen: native H(P)PR dunkelblau, Komplex-H(P)PR hellblau, 2gcg schwarz, 1gdh gelb, 2nad hellgrün, 2nac dunkelgrün, 1J49_A dunkelrot, 1J49_B braun, 1PSD lila, 1dxy orange. Für die Erklärung der Abkürzungen siehe Tabelle 7. 2gcg, 1J49_B und 2nac haben ähnliche Domänen-Öffnungswinkel wie die beiden H(P)PR Strukturen.

Um diese Vermutung zu bestärken, wurden die Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen genauer betrachtet. Hierfür wurde das Programm Contacsym verwendet (Sheriff et al., 1987). Die Domänen wurden, wie unter 17.3 beschrieben, aufgeteilt. Neben mehreren sekundär vermittelten Wasserstoffbrücken durch Wassermoleküle wurden auch einige direkte Wechselwirkungen beobachtet. Diese Wechselwirkungen konnten auf insgesamt 85 bestimmt werden, nachdem die Elektronendichte der jeweiligen Seitenketten überprüft wurden. Diejenigen Wechselwirkungen, die das Programm Contacsym errechnete, bei denen aber die

genaue Orientierung der Seitenketten nicht durch hinreichend vorhandene Dichte belegt werden konnte, wurden nicht in Betracht gezogen. Unter den übrig gebliebenen 85 Wechselwirkungen konnten 14 Wasserstoffbrücken-Bindungen und eine Salzbrücke beobachtet werden. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die meisten dieser Interaktionen in der Nähe der Übergangsregion der beiden Domänen lokalisiert sind. Da diese Positionen vermutlich wenig Auswirkungen auf die Stabilisierung der Gesamtstruktur haben, wurden Wechselwirkungen in der katalytischen Spalte zwischen den beiden Domänen genauer betrachtet. Jeweils drei Aminosäuren konnten in jeder Domäne identifiziert werden (Leu205, Arg232 und His279 in der Cosubstrat-Bindedomäne und Ser53, Gly77, Asp79 in der Substrat-Bindedomäne), die untereinander in Wechselwirkungen stehen. Diese sechs Aminosäuren bilden untereinander eine Salzbrücke (Asp79 OD1 zu Arg232 NE, 3,5 Å) und acht Van-der-Waals Kontakte, davon ein kurzer Van-der-Waals Kontakt (Ser53 CB zu Arg232 NH₂, 3,2 Å). In der NADP⁺-Komplexstruktur zeigen diese sechs Aminosäuren vergleichbare Konformationen.

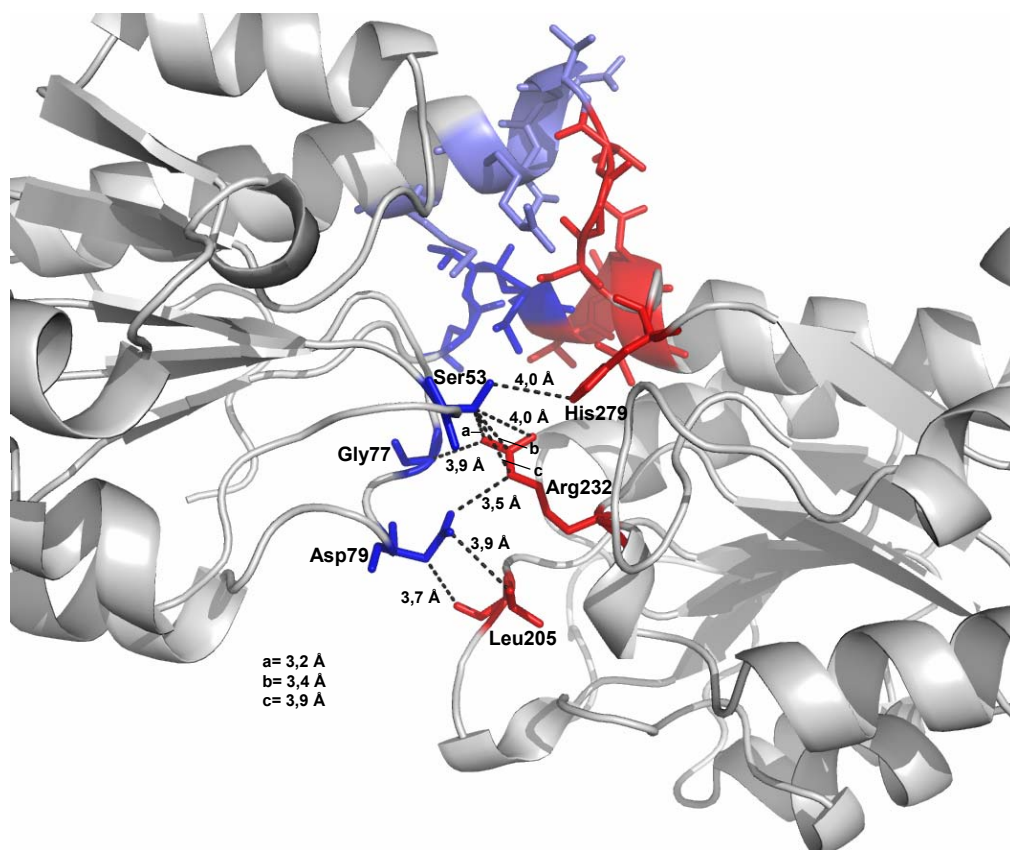


Abb. 62: Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen der nativen H(P)PR-Struktur. Rot dargestellte AS gehören der Cosubstrat-Bindedomäne an und blau gezeichnete AS liegen in der Substrat-Bindedomäne.

Da Gly77, His279 und Arg232 zu den konservierten Aminosäuren der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase Familie gehören und dadurch in den meisten Enzymen dieser Familie vorkommen, ist es unwahrscheinlich, dass es nur an diesen Aminosäuren liegt, dass beide H(P)PR-Strukturen in der geschlossenen Konformation vorliegen. Dennoch haben diese Interaktionen eine stabilisierende Wirkung und könnten zusammen mit dem Einfluss aus der Kristall-Umgebung zur geschlossenen Konformation führen.

20.4.3 Dimer-Bildung

Zur Bestimmung der Größe der heterolog exprimierten H(P)PR wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (vgl. 12.3). Durch Auftrennung von Standardproteinen unter gleichen Bedingungen konnte ein apparentes Molekulargewicht der H(P)PR (mit His-Tag) von 59,2 kDa bestimmt werden (vgl. 16.5). Dabei sollte darauf hingewiesen werden, dass bei der Größenausschlusschromatographie nicht das eigentliche Molekulargewicht sondern der hydrodynamische Radius eines Proteins gemessen wird. Der hydrodynamische Radius ist der Radius einer hypothetischen festen Kugel, die in einem Lösungsmittel dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Teilchen. Durch Vergleich mit Standardproteinen lässt sich das apparente Molekulargewicht eines Testproteins nur abschätzen. Der hydrodynamische Radius hängt von der Form bzw. Faltung eines Proteins ab. So würde sich für ein stabförmiges Protein ein höheres apparentes Molekulargewicht ergeben als für ein kugelförmiges Protein mit gleicher Masse (Voskamp, 2004). Daher soll das durch Größenausschlusschromatographie ermittelte apparente Molekulargewicht nur als Schätzwert gesehen werden.

Von K. H. Kim wurde die Größe der aus *Coleus blumei* Zellkulturen isolierten H(P)PR mit 45-68 kDa ermittelt (Kim et al., 2004), was mit der Größe der heterolog exprimierten H(P)PR gut korreliert. Bei einem errechneten Molekulargewicht des Monomers inklusive His-Tag von 36 kDa würde demnach ein Dimer vorliegen.

Diese Annahme wird zusätzlich durch kristallographische Daten gestützt. Das Dimer wird durch Anwendung der kristallographischen Symmetrie aus dem Monomer erhalten (vergl. Abb. 56). Weiterhin wurde die vergrabene Oberfläche berechnet. Dies ist die Fläche pro Monomer, die durch die Dimer-Bildung zwischen den beiden Monomeren eingeschlossen und dadurch von Lösungsmittel-Molekülen abgeschirmt wird. Bei einem Homodimer werden durchschnittlich 1685 \AA^2 pro Monomer eingeschlossen (Jones und Thornton, 1996).

Zur Berechnung der Oberfläche wurde das Programm MS mit der nativen Struktur und einem probe radius (entspricht ungefähr im Deutschen Sondenradius) von 1,4 Å verwendet. Durch die Dimer-Bildung werden im Durchschnitt 2141 Å² pro Monomer vergraben, wobei 2025 Å² (94,5%) in der Cosubstrat-Bindedomäne liegen und 116 Å² (5,5%) durch die Substrat-Bindedomäne vermittelt werden. Daraus ist ersichtlich, dass die Dimerisierung hauptsächlich über die Cosubstrat-Bindedomäne erfolgt.

Bei einer genaueren Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen den beiden Monomeren ergeben sich insgesamt 403 Interaktionen. Am häufigsten sind Van-der-Waals Wechselwirkungen mit 369 Interaktionen vertreten, aber auch 28 Wasserstoff-Brücken-Bindungen und 6 Salz-Brücken.

Des weiteren wurde der Sc-Wert (Shape Complementarity) mit dem Programm CCP4 berechnet (Lawrence und Colman, 1993). Dieser Wert gibt die Passgenauigkeit zweier Oberflächen wieder, also wie gut zwei Oberflächen sich aneinander anpassen. Dabei gehen die Werte von 0 bis 1, wobei 0 nicht-komplementär und 1 komplett komplementäre Oberflächen bedeutet. Bei hoch angepassten Oberflächen, wie z.B. bei Protease / Protease-Inhibitoren finden sich Sc-Werte von 0,65 – 0,75 (Radaev et al., 2002). Bei der H(P)PR ergab sich bei einem Sondenradius von 1,7 Å ein recht hoher Sc-Wert von 0,75, der auf eine sehr gute Oberflächenkomplementarität zwischen den beiden Monomeren hindeutet und dadurch die Annahme unterstützt, dass tatsächlich ein Dimer vorliegt.

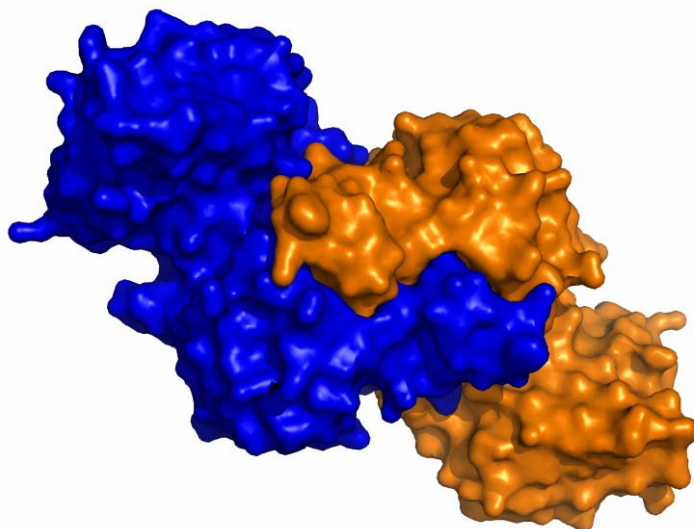


Abb. 63: Dimer der H(P)PR, Oberfläche berechnet mit Pymol.

20.4.4 Katalytische Spalte der Komplexstruktur

In der Komplexstruktur ist die Position des Cosubstrates durch die Dichte sehr gut definiert (vergleiche Abb. 54). Der durchschnittliche B-Faktor für NADP^+ ist $29,6 \text{ \AA}^2$, im Vergleich zu $30,1 \text{ \AA}^2$ für die Proteinatome. Man geht im Allgemeinen davon aus, dass Proteinatome, mit Ausnahme von flexiblen Bereichen wie z.B. einigen Seitenketten, in jeder Einheitszelle des Kristalls an gleicher Stelle vorkommen. Die Besetzung ist also 1. Der Temperaturfaktor B beschreibt eine dynamische Unordnung im Kristall durch temperaturabhängige Schwingung von Atomen und statistische Unordnung, die dadurch hervorgerufen wird, dass Moleküle in unterschiedlichen Einheitszellen nicht genau die gleiche Position und Orientierung aufweisen. Vergleicht man nun die beiden oben angegebenen B-Faktoren für den Cofaktor und die Proteinatome, so stellt man fest, dass diese in etwa gleich groß sind. Daher kann man darauf schliessen, dass NADP^+ in der H(P)PR Komplex-Struktur vollständig besetzt ist, d.h. dass der Cofaktor in jedem Proteinmolekül gebunden vorliegt. Würde der Cofaktor unvollständig besetzt sein, so würde der B-Faktor von NADP^+ größer als der der Proteinatome sein.

Der Cofaktor ist mit insgesamt 16 Wasserstoffbrücken an der Cosubstrat-Bindedomäne fixiert und weist eine leichte Drehung der Carboxamid-Gruppe aus der Pyridin-Ebene um etwa 31° auf. Normalerweise ist die Carboxamid-Gruppe parallel zum Pyridin-Ring orientiert. Bei der H(P)PR allerdings bildet die Carboxamid-Gruppe drei Wasserstoffbrücken zu Asp256, Ile230 und His279 aus und wird dadurch aus der Pyridin-Ebene herausgedreht. Ähnliche Drehwinkel wurden auch bei anderen Proteinen der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen Familie beobachtet (25° bei FDH, Lamzin et al., 1994; 20° bei D-LDH, Razeto et al., 2002).

Im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Enzymfamilie bevorzugt das vorliegende Enzym NADPH als Cofaktor. Für die Diskriminierung des Cofaktors wird ein Asparaginsäurerest verantwortlich gemacht, der verhindert, dass die negativ geladene Phosphatgruppe des NADPH binden kann; das Enzym kann dementsprechend nur NADH binden. In der klonierten H(P)PR befindet sich an dieser Stelle ein Serin (Ser174). Die Phosphat-Gruppe des Cofaktors in der Komplexstruktur bildet fünf Wasserstoffbrücken zu den benachbarten Aminosäuren Arg175 und Ser176. Weiterhin wird die Phosphat-Gruppe durch positiv geladene Aminosäuren in der Umgebung stabilisiert und dadurch die Bindung von NADPH als Cofaktor begünstigt (Tanaka et al., 1996). In der von Booth et al. (2006) publizierten Struktur der GRHPR, die ebenfalls NADPH als Cofaktor bevorzugt, befindet sich ein Glycin an der entsprechenden Stelle.

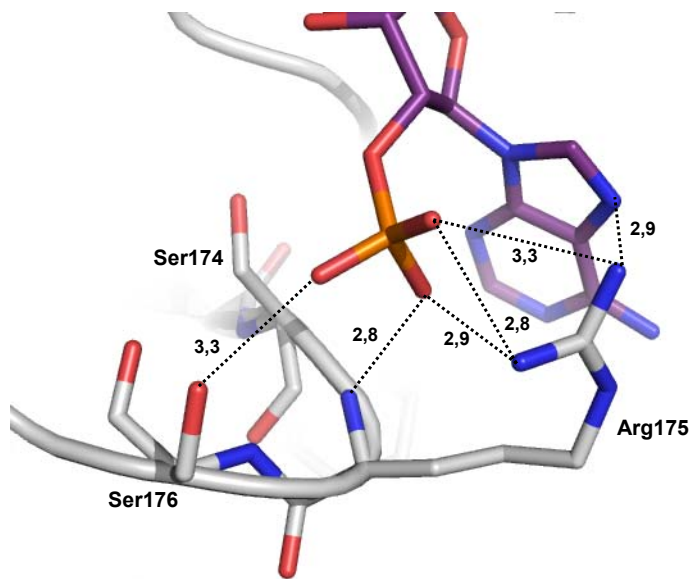


Abb. 64: Wechselwirkungen zwischen NADP⁺ (lila) und der heterolog exprimierten H(P)PR (grau). Dargestellt sind die Wasserstoffbrücken-Bindungen in Å.

Während der Verfeinerung der Komplexstruktur wurde signifikante Restelektronendichte (sigma 1,5) in der Gegend des aktiven Zentrums erhalten, in der das Substrat binden würde.

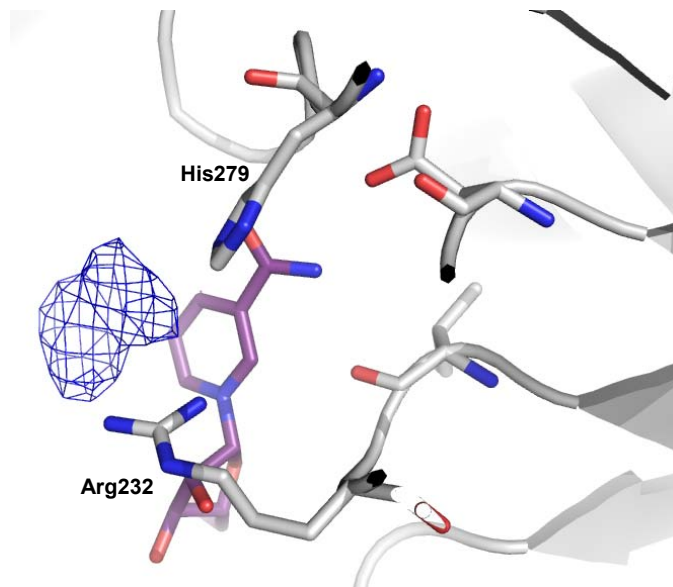


Abb. 65: Dichte im aktiven Zentrum in der Umgebung der Substrat-Bindestelle.

Wie unter 13.2.2 beschrieben, wurde dem Kristallisationsansatz der Komplexstruktur neben NADP⁺ auch pHPP zugesetzt. Leider war die beobachtete Dichte für pHPP zu klein und auch Versuche, das Substrat in der Elektronendichte zu verfeinern, scheiterten. Es wurde schnell offensichtlich, dass die erhaltene Elektronendichte nicht zu dem kokristallisierten Substrat

passte, da dieses zu groß war. Die Elektronendichte schien zwar dem Pyruvat-Teil des pHPP gut zu entsprechen aber der Hydroxyphenyl-Teil konnte nicht eingepasst werden. Bei Verfeinerungen mit pHPP entstand negative Dichte um den Phenylring, was darauf hindeutete, dass der Phenylring nicht in der Struktur vorhanden war. Die Dichte könnte einem eher kleinen Molekül entsprechen, wie z.B. Pyruvat, das in der Tat sehr gut in die Dichte passt und dann auch den Bindungsvorhersagen nach Modell A (siehe nächster Abschnitt) entsprechen würde. NMR-Analysen der für den Kristallisationsansatz verwendeten Chemikalien auf Pyruvat als Verunreinigung, wie es im Fall der GRHPR festgestellt wurde (Booth et al, 2006), führten zu keinem Erfolg. Auch eine Zersetzung des pHPP Moleküls im Kristallisationsansatz scheint sehr unwahrscheinlich. Die einzige mögliche Ursache wäre, dass Pyruvat bei der Proteinaufreinigung aus Bakterien so stark an das Enzym gebunden ist, dass es mit aufgereinigt wird. Eine starke Bindung von Pyruvat im aktiven Zentrum der nativen HPPR wird von E. Häusler vermutet (1989). Sie geht davon aus, dass Pyruvat das aktive Zentrum nicht mehr verlassen kann. In der nativen Struktur konnte kein Substrat beobachtet werden, was gegen eine solche Verschleppung an Pyruvat spricht, obwohl es sich hierbei um eine andere Proteincharge handelte. Weitere Strukturanalysen könnten Aufschluss geben über das beobachtete Substrat und dessen Herkunft.

20.4.5 Substrat-Bindungsmodelle

Das katalytische Zentrum der H(P)PR befindet sich im Spalt zwischen den beiden Domänen. Das aktive Zentrum wird vor allem von den Aminosäuren Arg232 und His279 gebildet. His279 wird durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu Glu261 in der protonierten Form gehalten. Diese drei Aminosäuren finden sich auch bei weiteren Vertretern der Enzymfamilie (DHicDH, Arg234, His295, Glu263; GDH: Arg240, His287, Glu269; D-LDH: Arg235, His296, Glu264), und es wird angenommen, dass diese essentiell für die Katalyse sind. Dabei werden zwei verschiedene Arten der Substratbindung beschrieben. Abbildung 66 gibt diese schematisch anhand der H(P)PR-Komplexstruktur wieder.

Modell B ist das ältere der beiden Bindungsmodelle. Es wurde zuerst von Lamzin et al. (1994) für die Formiat Dehydrogenase postuliert, welche die Oxidation des Formiat-Anions zu CO₂ katalysiert und damit nicht stereospezifisch ist. Im selben Jahr publizierten Goldberg et al. (1994) für ihre Struktur der D-Glycerat Dehydrogenase einen ähnlichen Bindungsmodus, der von der Substratbindung in L-LDHs abgeleitet wurde. Dabei sei erwähnt, dass in der GDH-Struktur sowohl das Cosubstrat als auch die Substratbindung

modelliert wurden. Zuvor musste die Position des an der Katalyse beteiligten Arginins (Arg235) verändert werden, da es in der D-Glycerat Dehydrogenase-Struktur (PDB code: 1gdh) vom katalytischen Zentrum weg zeigt. Weiterhin ist eine Struktur der D-LDH in der PDB-Datenbank deponiert, die einen vergleichbaren Bindungsmodus für das Substrat aufweist (2dld). Die Daten wurden bislang nicht an anderer Stelle veröffentlicht.

Im Bindungsmodell B bildet Arg232 (Arg235 in der D-Glycerat Dehydrogenase-Struktur; PDB code: 1gdh) zwei Wasserstoffbrücken zu der Carboxylgruppe des Substrates aus. Die Carboxylgruppe ist weiterhin durch Wechselwirkung mit His279 koordiniert, durch welches die Gruppe in protonierter Form gehalten wird. Zusätzlich wird das Substrat durch eine Wasserstoffbrücke vom Sauerstoffatom der Carbonylgruppe zum Amid des Grundgerüsts stabilisiert. Wenn man davon ausgeht, dass der Protonen-Transfer in dieser Bindung von unterhalb der Ebene geschieht, würde das S-Enantiomer entstehen. Bei der D-Glycerat Dehydrogenase Struktur (PDB code: 1gdh) zeigt die Carbonylgruppe in Richtung des Histidin (His287 in 1gdh und entsprechend His279 in H(P)PR). Das Substrat ist also um 180° um die C₁-C₂ Achse gedreht, was dazu führt, dass das R-Enantiomer entsteht.

Modell A wurde von Vinals et al. (1995) von der Formiat Dehydrogenase Struktur abgeleitet. Weitere Autoren griffen dieses Modell später auf und benutzten es, um Substrate in ihre Strukturen einzupassen (Stoll et al., 1996; Dengler et al., 1997; Razeto et al., 2002). Dabei enthielt die D-HicDH Struktur von Dengler et al. (1997) 2-Oxoisocaproat als Substrat. Die exakte Positionierung konnte allerdings nicht genau vorhergesagt werden, da eine Sulfation mit dem Substrat um die Position im aktiven Spalt konkurrierte. Erst Booth et al. gelang es 2006, die Positionierung des Substrates anhand eindeutiger Dichte zu bestätigen. In ihrer GR/HPR-Struktur bindet Hydroxypyruvat, das als Verunreinigung des eigentlichen co-kristallisierten Oxalats festgestellt wurde.

In Modell A ist das Substrat anders orientiert. Die Carboxylat-Gruppe des Substrates bildet Wasserstoffbrücken zum Amid-Grundgerüst von Val76 und Gly77. Arg232 bildet Wechselwirkungen zum Carboxylat-Sauerstoff-Atom und zum Sauerstoffatom der Carbonylgruppe. Dieses Carbonyl-Sauerstoff-Atom ist zusätzlich durch His279 fixiert, welches wiederum durch eine Wasserstoffbrücke zu Glu261 in Position gehalten wird. Die zuletzt genannte Wasserstoffbrücke ist für die protonierte Form von His279 verantwortlich, welches dadurch die Carbonylfunktion protonieren könnte. Die Protonen-Übertragung vom NADPH zum Substrat würde so unterhalb der Ebene erfolgen und dadurch zum R-Enantiomer führen.

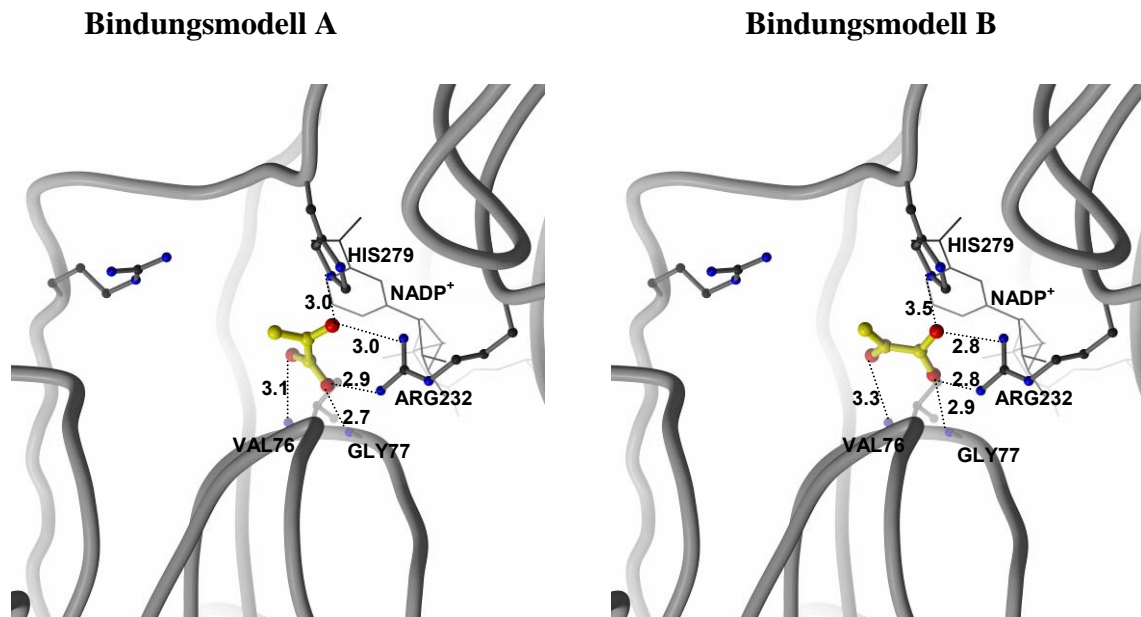


Abb. 66: Substrat-Bindungsmodelle anhand der H(P)PR Komplexstruktur mit Pyruvat als Substrat.

20.5 Substratdocking

Um die Positionierung der verschiedenen Substrate in der H(P)PR vorherzusagen, wurde, wie unter 18 beschrieben, ein Substrat-Docking durchgeführt. Dabei wurden fünf verschiedene Substratstrukturen verwendet (pHPP, DHPP, Phenylpyruvat, Hydroxypyruvat und Pyruvat), die mit Hilfe des Programms Autodock (Morris et al., 1998) in die Komplexstruktur hineingepasst wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 auf Seite 103 zusammengefasst.

Wie zu erkennen ist, wurden hauptsächlich die beiden unter 20.4.5 beschriebenen Bindungsmodi A und B gefunden. Für kleine Substrate ohne Phenylring (Pyruvat und Hydroxypyruvat) scheint Bindungsmodus A energetisch begünstigt zu sein. Dies erkennt man zum einen daran, dass im ersten Cluster mit dem Bindungsmodus A viele Dockinglösungen zusammengefasst wurden (etwa 50% bei Hydroxypyruvat und 90% bei Pyruvat). Auch sind die Differenzen zum nächsten Cluster groß genug um einen energetischen Unterschied darzustellen.

Interessanterweise wurden für Substrate mit Phenylring beide Substratbindungsmodelle als etwa gleich wahrscheinlich berechnet. Für pHPP scheint der Bindungsmodus B sogar etwas begünstigt zu sein. Die errechneten niedrigsten Dockingenergien unterscheiden sich nur geringfügig, so dass keine definitive Aussage getroffen werden kann, welcher der beiden Modi vom energetischen Standpunkt aus bevorzugt wird. Leider ist es im Rahmen dieser

Arbeit nicht gelungen, die H(P)PR mit gebundenem pHPP zu kristallisieren. Daher kann für die Substrate mit Phenylring keine Aussage getroffen werden, wie diese in der katalytischen Spalte binden. Jedoch konnten Hinweise gewonnen werden, dass nur das D-pHPL gebildet wird, was zumindest ableiten lässt, dass pHPP nur im Bindungsmodus A umgesetzt wird. Dengler et al. (1997) vermuten für die D-HicDH eine nicht-produktive Bindung von mittelgroßen Substraten an ein Arginin in der Nähe des katalytischen Zentrums, was zu langsamen Umsätzen mit Nicht-Michaelis-Menten-Kinetik und auftretender Substratinhibierung führt. In der H(P)PR kommt solch ein Arginin nicht vor, aber die Ergebnisse des Dockings könnten vermuten lassen, dass solch eine unproduktive Substratbindung auch für Phenylpyruvate in der H(P)PR stattfindet, indem das Substrat im Bindungsmodus B bindet. Da Phenylpyruvat zu schlecht umgesetzt wurde, von DHPP nicht genügend Substanz verfügbar war und bei pHPP durch analytische Restriktionen der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde, kann darüber keine Aussage gemacht werden. Dennoch stellt dies eine Möglichkeit dar und sollte bei zukünftigen Analysen in Betracht gezogen werden.

20.6 Schlussfolgerung

Das heterolog exprimierte Enzym, dem eine Funktion als Hydroxyphenylpyruvat Reduktase vorhergesagt wurde, zeigt zwar die meisten Grundcharakteristika des nativen Enzyms, weist aber auch grundlegende Unterschiede auf. Der wohl wichtigste Unterschied ist in der Substratspezifität zu sehen. Zunächst sei hervorgehoben, dass die von der HPPR durchgeführte Reduktion von pHPP zum entsprechenden Laktat von dem klonierten Enzym katalysiert wird. Da es sich bei vorhergehenden Charakterisierungen der HPPR immer um Enzymmischungen gehandelt hat (Häusler et al., 1991; Meinhard, 1992), ist ein direkter Vergleich der ermittelten Werte schwierig, da Kreuzreaktionen anderer Enzyme in der Enzymmischung nicht ausgeschlossen werden können. Obwohl Unterschiede zwischen der klonierten H(P)PR und der nativen HPPR festgestellt wurden, könnte das klonierte Enzym dennoch *in vivo* an der Rosmarinsäure-Biosynthese beteiligt sein und die Reduktion von pHPP als Nebenreaktion katalysieren. Um auszuschließen, dass die klonierte H(P)PR an der RA-Biosynthese beteiligt ist, indem sie pHPP zu pHPL reduziert, müsste das Enzym *in vivo* z.B. durch RNAi ausgeschaltet werden. Auswirkungen auf den Rosmarinsäuregehalt würden die Rolle des vorliegenden Enzyms klären. Dennoch scheint die wesentlich bessere Akzeptanz von Hydroxypyruvat auf eine andere Funktion *in vivo* hinzudeuten. Besonders

wenn man andere Unterschiede zur nativen HPPR in Betracht zieht. So wurden Unterschiede im Temperaturoptimum und in den K_m -Werten für die Cosubstrate NADPH bzw. NADH und die unterschiedlichen Aktivitäten mit ihnen festgestellt. Weiterhin spräche die Tatsache, dass sehr ähnliche Proteine in Pflanzen gefunden wurden, die keine Rosmarinsäure bilden, dafür, dass dem Enzym zumindest eine andere Hauptfunktion zukommt.

Die Substratpräferenz und strukturelle Ähnlichkeiten zu den Proteinen GR/HPR und GDH deuten darauf hin, dass es sich um eine Hydroxypyruvat Reduktase handeln könnte. Dabei sei betont, dass zwar hohe strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der H(P)PR und dem menschlichen Enzym GR/HPR (PDB code: 2gcg) bzw. dem aus Bakterien stammenden Protein GDH (PDB code: 1gdh) vorliegen, aber auf Nukleotid- bzw. Aminosäure-Ebene die Identitäten recht gering sind. (Identitäten auf Aminosäureebene: 31% 1gdh, 33% 2gcg). Die höchsten Homologien auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene kommen bei pflanzlichen Enzymen vor, für die allerdings keine Funktion nachgewiesen wurde (vergl. 19.1).

Die nativ gewonnene HPPR wurde aus der löslichen Fraktion eines *Coleus blumei* Zellextraktes isoliert und ist daher ein lösliches Protein. Wie gezeigt werden konnte, bevorzugt es NADPH als Cofaktor, und es könnte sich daher um eine im Cytosol vorkommende HPR-2 handeln. Diese Gruppe von Enzymen wurde aus mehreren Pflanzen charakterisiert, aber bis heute ist noch keine Sequenz bekannt. Obwohl die Funktion dieser Enzymklasse nicht eindeutig geklärt ist, geht man davon aus, dass sie Hydroxypyruvat, das in das Cytosol gelangt ist, in D-Glycerat umsetzt. Dadurch wäre das Enzym, wie die in Peroxisomen vorkommende HPR-1, an der Photorespiration in Pflanzen beteiligt, was erklären würde, warum es in Pflanzen zu finden ist, die keine Rosmarinsäure bilden. Die Photorespiration ist ein ubiquitär in Pflanzen in photosynthetisch aktiven Geweben vorkommender Prozess und die beteiligten Enzyme daher weit verbreitet. Von der HPR-2 ist bekannt, dass sie Glyoxylat mit geringerer Aktivität umsetzt, was auf das vorliegende klonierte Enzym zutreffen würde. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Enzymaktivität der HPR-2 durch Oxalat gehemmt wird (Kleczkowski et al., 1991). Eine Inhibierung durch Oxalat konnte auch bei der klonierten H(P)PR gemessen werden (nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Was allerdings gegen die Theorie, dass es sich bei dem vorliegenden Protein um ein an der Photorespiration beteiligtes Enzym handelt, ist die Tatsache, dass die mRNA, die für das vorliegende Enzym codiert, aus Zellsuspensionskulturen von *Coleus blumei*, die im Dunkeln kultiviert wurden, isoliert wurde. Da die Photorespiration ein Licht-abhängiger Prozess ist, ist es unwahrscheinlich, dass Photorespiration in diesen Zellkulturen stattgefunden hat. Daher sollten Enzyme, die an diesem Prozess beteiligt sind, auch nicht exprimiert werden.

Um mit Sicherheit die *in vivo* Funktion des vorliegenden Enzyms bestätigen zu können, müssten weitere Tests durchgeführt werden. Eine Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit neu entdeckten Enzyme aus Paprika und Aubergine könnten dabei hilfreich sein.

Die Struktur des heterolog exprimierten Enzyms zeigt eindeutige Merkmale der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase Familie, von der noch nicht viele Proteinstrukturen bekannt sind. Ein Vergleich der nativen Struktur mit der Komplexstruktur zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Domänenbewegung, wie es bei einigen dieser Proteine beobachtet wurde und für andere vorhergesagt wurde. Dies könnte ein weiteres Beispiel für eine Beeinflussung der Konformation durch die Kristallumgebung sein und sollte weiter untersucht werden. Da beim Docking größerer Substrate wie Phenylpyruvaten kein eindeutiger Bindungsmodus vorhergesagt werden konnte, sollte versucht werden, Kristallstrukturen des Proteins mit diesen Substraten zu erhalten.

V Zusammenfassung

Das heterolog exprimierte Protein einer in der vorangegangenen Doktorarbeit von Dr. K. H. Kim als Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) isolierten cDNA-Sequenz aus Suspensionkulturen von *Coleus blumei* wurde in dieser Arbeit charakterisiert und zwei Kristallstrukturen erstellt.

Das Enzym HPPR katalysiert die Reduktion von Hydroxyphenylpyruvaten zu den entsprechenden Laktaten und soll an der Biosynthese von Rosmarinsäure in Pflanzen beteiligt sein. Nach Klonieren der putativen H(P)PR cDNA, konnte das Enzym in Bakterien exprimiert und über den durch die Expression angehängten His-Tag aufgereinigt werden. Eine Charakterisierung des Enzyms zeigte abweichende Werte zur nativen HPPR, mit einem höheren Temperaturoptimum, abweichenden Werten bei den K_m -Werten für die Cosubstrate NADH und NADPH und vor allem Unterschieden in der Substratspezifität. Während für das native Enzym 4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) als das natürliche Substrat mit einem apparenten K_m -Wert von 10 bzw. 80 μ M bestimmt wurde, lag für das gleiche Substrat bei der heterolog exprimierten H(P)PR der apparente K_m -Wert mit 16,6 mM deutlich höher. Dabei sei vermerkt, dass bei der Bestimmung einiger Substrate Probleme bei der Messbarkeit auftraten und daher der Sättigungsbereich mit pHPP als Substrat nicht erreicht wurde. Weiterhin konnten Substrate identifiziert werden, die wesentlich besser umgesetzt wurden. So wurde der apparente K_m -Wert von Hydroxypyruvat mit ca. 1 mM bei starker Substrathemmung und der von Glyoxylat mit 2 mM bestimmt. Eine Mutation der H(P)PR-cDNA konnte durch Klonierung und Sequenzierung der H(P)PR aus zwei *Coleus blumei* Pflanzen ausgeschlossen werden. Das Vorkommen sehr ähnlicher Enzyme in anderen Pflanzen, die keine Rosmarinsäure bilden, verstärkte die Vermutung, dass dem klonierten Enzym möglicherweise eine andere Hauptfunktion *in vivo* zukam. Bei der Suche nach verwandten Enzymen in anderen Pflanzen konnten zwei neue Sequenzen aus Paprika und Aubergine aus der Familie der Solanaceae mit einer Identität zu dem klonierten Enzym auf Aminosäure-Ebene von 83,1% bzw. 83,4% isoliert werden.

Neben der Enzymcharakterisierung wurde die klonierte H(P)PR kristallisiert und sowohl eine native Struktur als auch eine NADP^+ -Komplexstruktur bestimmt. Die Struktur weist den allgemeinen Aufbau der D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase Enzymfamilie auf. Das Protein bildet zwei Domänen: Die kleinere der beiden Domänen ist für die

Substratbindung verantwortlich, während die andere das Cosubstrat bindet. Zwischen den beiden Domänen liegt das katalytische Zentrum. Von verwandten Enzymen ist bekannt, dass die Domänen unterschiedliche Bindungswinkel annehmen, je nach Bindung von Substrat und Cosubstrat. Für die beiden H(P)PR-Strukturen konnte kein signifikanter Unterschied im Bindungswinkel festgestellt werden. Ein Vergleich der H(P)PR-Struktur mit anderen Kristallstrukturen zeigte trotz sehr geringer Identitäten auf Nukleotid- und Aminosäureebene eine hohe Ähnlichkeit zu einer bakteriellen D-Glycerat Dehydrogenase und einer menschlichen Glycerat Dehydrogenase/Hydroxypyruvat Reduktase. Dies könnte ein Hinweis auf die eigentliche Funktion des heterolog exprimierten Enzyms sein. Da es nicht gelungen war, pHPP im Enzym mitzukristallisieren, wurden computersimulierte Docking-Versuche durchgeführt. Dabei schien für Substrate mit Phenylring keine eindeutige Bindung vorhersagbar zu sein, während für kleinere Substrate eine eindeutigere Lösung angezeigt wurde. Diese gefundene Lösung entspräche einem Bindungsmodus, der bereits für andere Proteine vorhergesagt wurde.

Die Ergebnisse aus den enzymatischen Untersuchungen und auch die Auswertung der Kristallstrukturen deuten auf eine andere Hauptfunktion des klonierten Enzyms hin, obwohl die Beteiligung an der Rosmarinsäure-Biosynthese als weitere Reaktion nicht ausgeschlossen ist. Eine mögliche Funktion könnte eine Beteiligung an der Photorespiration sein, was das Vorkommen verwandter Enzyme in anderen, nicht Rosmarinsäure-haltigen Pflanzen erklären würde. Aus unterschiedlichen Pflanzen wurde eine Hydroxypyruvat Reduktase (HPR-2) beschrieben, die im Cytosol vorkommt, NADPH als Cofaktor benutzt und Hydroxypyruvat zu D-Glyoxylat reduziert. Von der HPR-2 sind bislang noch keine Sequenzen und auch keine Kristallstrukturen bekannt. Gegen diese Theorie spräche allerdings, dass die für dieses Enzym codierende mRNA aus Dunkel-Zellkulturen von *C. blumei* isoliert wurde. Im Dunklen sollte keine Photorespiration stattfinden und die an diesem Prozess beteiligten Enzyme sollten demnach auch nicht exprimiert werden. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um die Funktion des klonierten Enzyms eindeutig zu klären, aber erste Hinweise deuten auf eine mögliche Funktion des klonierten Enzyms als HPR-2.

VI Summary

In this thesis a protein is characterised, which was formerly isolated from cell suspension cultures of *Coleus blumei* and identified as hydroxyphenylpyruvate reductase (Kim, 2004). Furthermore two crystal structures, one of the native protein and one complexed with NADP⁺, are presented in this work.

Hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) catalyses the reduction of hydroxyphenylpyruvates to the corresponding lactates. The enzyme is thought to be involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in plants. After the putative HPPR cDNA was cloned and transformed into *E. coli* the protein was expressed by bacteria adding a His-Tag to the N-terminus of the protein. This His-Tag was used for purification of the H(P)PR.

During characterisation of the putative H(P)PR some differences to the native protein were observed. The differences included a higher temperature optimum, different K_m -values for the cosubstrates NADH and NADPH and most importantly differences in the substrate specificity. The K_m -value for the proposed natural substrate 4-hydroxyphenylpyruvate (pHPP) with the native enzyme was determined as 10 and 80 μ M respectively. For the same substrate the K_m -value was 16.6 mM using the heterologously expressed H(P)PR. This is significantly higher compared to the values observed for the native enzyme.

It should be mentioned that for pHPP substrate saturation could not be reached as high substrate concentrations could not be analysed by the available methods.

For the heterologously expressed H(P)PR substrates that were better accepted than pHPP could be identified. The best accepted substrates were hydroxypyruvate with a K_m -value of appr. 1 mM followed by glyoxylate with 2 mM. By determining two H(P)PR sequences from two *Coleus blumei* plants a mutation in the H(P)PR gene could be ruled out. As similar cDNAs/genes are known from different plants which do not produce rosmarinic acid as metabolite, doubts emerged if it is really the major role of the putative H(P)PR *in vivo* to be involved in rosmarinic acid biosynthesis. For further investigation two new protein sequences from two plants of the Solanaceae family were identified. Their amino acid sequence is 83.1% and 83.4% identical to the H(P)PR sequence.

The protein was crystallised and two protein structures were determined. One is a structure of the native protein and in the other H(P)PR is complexed with NADP⁺. The overall structure shows the characteristic two-domain structure of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid

dehydrogenase protein family. The smaller of the two domains is responsible for the binding of the substrate, whereas the other one binds the cosubstrate. The catalytic cleft is located between both domains. For other structures a flexibility of the domains was reported as the domains move towards each other after binding of substrate and/or cosubstrate. For the two H(P)PR structures no significant change in the opening angles was observed. Comparison with similar structures revealed high similarities to the structures of a D-glycerate dehydrogenase from bacteria and a human glycerate dehydrogenase/ hydroxypyruvate reductase although the similarities on the basis of nucleotide and amino acid sequences are rather low. This similarity could give first indication to the main *in vivo* role of the enzyme. As no crystal structure with substrate was achieved by co-crystallisation, several substrates were docked into the catalytic cleft. For large substrates with a phenyl ring no clear binding mode was observed. However for smaller substrates a distinct binding mode was indicated, which is consistent with substrate binding modes found for other D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenases.

The results obtained from enzyme characterisation and comparison with similar protein structures indicate a different main role of the enzyme in plants. Nevertheless, it should be emphasised that an involvement of the enzyme in rosmarinic acid biosynthesis as a side function is still conceivable. A possible main function could be the involvement in photorespiratory processes. This could explain the appearance of similar enzymes in plants, which do not accumulate rosmarinic acid as secondary metabolite. From other plants a cytosolic hydroxypyruvate reductase (HPR-2) was described, using preferably NADPH as cofactor to reduce hydroxypyruvate to D-glycerate. HPR-2 is thought to be involved in photorespiration. Unfortunately no sequences or crystal structures of the HPR-2 are known to date. However, this theory is not supported by the fact that the mRNA, which was used to establish the H(P)PR-cDNA, was isolated from cell cultures of *Coleus blumei* that were grown in the dark. It is not expected that photorespiration occurs in the dark. Therefore genes coding for proteins involved in this process should not be expressed.

Further investigation is necessary to prove the *in vivo* role of the cloned enzyme but first characteristics indicate the enzyme being a putative HPR-2.

VII Referenzen

- Alves L., Cyrne L., Amaral-Collaco M. T. und Gírio F. M. (2003).** Evidence of aerobic and anaerobic format dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase immunological similarities shown by polyclonal antibodies raised against molybdoproteins. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19:201-208.
- Ammon H. P. und Müller A. B. (1985).** Forskolin: from an Ayurvedic remedy to a modern agent. *Planta Med.*, 6:473-477.
- Anderson I. W. und Emes M. J. (1985).** Purification and Properties of Hydroxypyruvate Reductase from *Lemna minor* L. *Int. J. Biochem.*, 17:1085-1089.
- Anthony C. (1982).** *Biochemistry of Methylophs*. London: Academic Press.
- Aquino R., Ciavatta M. L., De Simone F. und Pizza C. (1990).** A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. *Phytochemistry*, 29:2358-2360.
- Arakawa T. und Timasheff S. N. (1985).** Theory of protein solubility. *Meth. Enzymol.*, 114:49-77.
- Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Eddy S. R., Griffiths-Jones S., Howe K. L., Marshall M. und Sonnhammer E. L. (2002).** The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.*, 30:276-280.
- Bennett M. D. und Leitch I. J. (1995).** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76:113-176.
- Berger A. (2001).** Versuche zur Klonierung der Rosmarinsäuresynthase und anderer Gene der Rosmarinsäure-Biosynthese aus *Coleus blumei*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Berger A., Meinhard J. und Petersen M. (2006).** Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta*, 224:1503-1510.
- Bernard N., Delcour J., Alvarez A., Cortes A., Willis C. und Holbrook J. J. (1995).** Dehydrogenases Engineering to Correct Substrate Inhibition in a Commercial Dehydrogenase. Eintrag in die PDB Datenbank (PDB code: 2dld).
- Boldt R., Edner C., Kolukisaoglu Ü., Hagemann M., Weckwerth W., Wienkoop S., Morgenthal K. und Bauwe H. (2005).** D-Glycerate 3-Kinase, the Last Unknown Enzyme in the Photorespiratory Cycle in *Arabidopsis*, Belongs to a Novel Kinase Family. *Plant Cell*, 17:2413-2420.
- Booth M. P. S., Connors R., Rumsby G. und Brady R. L. (2006).** Structural Basis of Substrate Specificity in Human Glyoxylate Reductase/Hydroxypyruvate Reductase. *J. Mol. Biol.*, 360:178-189.

- Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Brunger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jjiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T. und Warren G. L. (1998).** Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, D54:905-921.
- Burns K. E., Xiang Y., Kinsland C. L., McLafferty F. W. und Begley T. P. (2005).** Reconstitution and Biochemical Characterization of a New Pyridoxal-5'-Phosphate Biosynthetic Pathway. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:3682-3683.
- Case D. A., Darden T. A., Cheatham III T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Pearlman D. A., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Wong K. F., Paesani F., Wu X., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Mathews D. H., Schafmeister C., Ross W. S. und Kollman P. A. (2006).** Amber 9, University of California, San Francisco.
- Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I. D. und Rémy R. (1993).** Identification of a Major Soluble Protein in Mitochondria from Nonphotosynthetic Tissues as NAD-Dependent Formate Dehydrogenase. *Plant Physiol.*, 102:1171-1177.
- De-Eknamkul W. und Ellis B. E. (1987a).** Tyrosine aminotransferase: the entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 26:1941-1946.
- De-Eknamkul W. und Ellis B. E. (1987b).** Purification and characterization of tyrosine aminotransferase activities from *Anchusa officinalis* cell cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 257:430-438.
- De Loureiro J. (1790).** "Flora Cochinchinensis" Band 2, S. 272. Academiae Ulyssipone, Lissabon.
- Dengler U., Niefind K., Kieß M. und Schomburg D. (1997).** Crystal Structure of a Ternary Complex of D-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, NAD⁺ and 2-Oxoisocaproate at 1.9 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 267:640-660.
- De Souza N. J. und Shah V. (1988).** Forskolin – an adenylate cyclase activating drug from an Indian herb. In: Wagner H., Hikino H., Farnsworth N. R. *Economic and Medicinal Plant Research*, Band 2, S. 1-16. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- De Tommasi N., De Simone F., De Feo V. und Pizza C. (1991).** Phenylpropanoid Glycosides and Rosmarinic Acid from *Momordica balsamina*. *Planta Med.*, 57:201.
- Di Salvo M. L., Safo M. K., Musayev F. N., Bossa F. und Schirch V. (2003).** Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1647:76-82.

- Dubrow R. und Pizer L. I. (1977).** Transient kinetic studies on the allosteric transition of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 252 (5):1527-1538.
- Dym O., Pratt E. A., Ho C. und Eisenberg D. (2000).** The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(17):9413-9418.
- Ellis B. E. und Towers G. H. N. (1970).** Biogenesis of Rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem. J.*, 118:291-297.
- Ehrenshaft M., Bilski P., Li M. Y., Chignell C. F. und Daub M. E. (1999).** A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9374-9378.
- Gardener A. (1855).** *Coleus blumei*. *The Florist*, 8:285-286.
- Garvie E. I. (1980).** Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiological Reviews*, 44:106-139.
- Genau A. (2002).** Die Biosynthese des Vitamin B₆ und des Ginkgotoxins als Beispiel einer Konvergenz. Klonierung und Expression eines sor-homologen Gens aus *Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Goldberg J. D., Yoshida T. und Brick P. (1994).** Crystal Structure of a NAD-dependent D-Glycerate Dehydrogenase at 2.4 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 236:1123-1140.
- Graham C. M., Ehrenshaft M., Hausner G. und Reid D. M. (2004).** A highly conserved gene for vitamin B₆ biosynthesis may have consequences for stress and hormone responses in plants. *Physiologia Plantarum*, 121:8-14.
- Grant G. A. (1989).** A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1371-1374.
- Greenler J. M., Sloan J. S., Schwartz B. W. und Becker W. M. (1989).** Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding NADH-dependent hydroxypyruvate reductase from cucumber. *Plant Mol. Biol.*, 13:139-150.
- Giuliano G., Bartley G. E. und Sclonik P. A. (1993).** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, 5:379-387.
- Ha J. Y., Lee J. H., Kim K. H., Kim D. J., Lee H. H., Kim H.-K., Yoon H.-J. und Suh S. W. (2006).** Overexpression, crystallisation and preliminary X-ray crystallographic analysis of erythronate-4-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Cryst.*, F62:139-141.
- Ha, J. Y., Lee, J. H., Kim, K. H., Kim, D. J., Lee, H. H., Kim, H. K., Yoon, H. J., Suh, S. W. (2007).** Crystal Structure of D-Erythronate-4-phosphate Dehydrogenase Complexed with NAD. *J. Mol. Biol.*, 366:1294-1304.

- Häusler E. (1989).** Charakterisierung der Hydroxyphenylpyruvatreduktase aus Suspensionskulturen von *Coleus blumei*. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.
- Häusler E., Petersen M. und Alfermann A. W. (1991).** Hydroxyphenylpyruvate reductase from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. *Z. Naturforsch.*, 46c:371-376.
- Häusler E., Petersen M. und Alfermann A. W. (1992).** Rosmarinsäure in *Blechnum*-Species. In: Haschke H. P. und Schnarrenberger C. Botanikertagung 1992 Berlin, S. 507. Akademie Verlag, Berlin.
- Hayward S. und Berendsen H. J. C. (1998).** Systematic Analysis of Domain Motions in Proteins from Conformational Change; New Results on Citrate Synthase and T4 Lysozyme. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 30:144-154.
- Hayward S., Kitao A. und Berendsen H. J. C. (1997).** Model-Free Methods of Analyzing Domain Motions in Proteins from Simulation: A Comparison of Normal Mode Analysis and Molecular Dynamics Simulation of Lysozyme. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 27:425-437.
- Hill R. E., Himmeldirk K., Kennedy I. A., Pauloski R. M., Sayer B. G., Wolf E. und Spenser I. D. (1996).** The Biogenetic Anatomy of Vitamin B6. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of Pyridoxol in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 271:30426-30435.
- Hiller K. (1965).** Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. - Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. *Pharmazie*, 20:574-579.
- Ho C.-L., Noji M., Saito M. und Saito K. (1999).** Regulation of Serine Biosynthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 274:397-402.
- Holm L. und Park J. (2000).** DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics*, 16:566-567.
- Holzmannova V. (1995).** Kyselina rosmarinová její biologická aktivita. *Chem. Listy*, 90: 486-496.
- Hummel W., Schütte H. und Kula M.-R. (1985).** D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21:7-15.
- Hummel W. und Kula M.-R. (1989).** Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.*, 184:1-13.
- Hutchinson E. G. und Thornton J. M (1996).** PROMOTIF - A program to identify structural motifs in proteins. *Protein Science*, 5:212-220.
- Jones S. und Thornton J. M. (1996).** Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13-20.

- Jones T. A., Zou J. Y., Cowan S. W. und Kjeldgaard M. (1991).** Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, A47:110-119.
- Kallwass H. K. W. (1988).** Proteinchemische und enzymatische Charakterisierung der D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus casei*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Karwatzki B., Petersen M. und Alfermann A. W. (1989).** Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.*, 55:663-664.
- Kelley C. J., Mahajan J. R., Brooks L. C., Neubert L. A., Breneman W. R. und Carmack M. (1975).** Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *J. Org. Chem.*, 40:1804-1815.
- Kempin B. (1994).** Untersuchungen zur Rosmarinsäuresynthese in Suspensionskulturen von *Coleus blumei*: Tyrosin Aminotransferase. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kim K. H., Janiak V. und Petersen M. (2004).** Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. *Plant Mol. Biol.*, 54:311-323.
- Kleczkowski L. A. und Randall D. D. (1988).** Purification and characterization of a novel NADPH(NADH)-dependent hydroxypyruvate reductase from spinach leaves. Comparison of immunological properties of leaf hydroxypyruvate reductases. *Biochem. J.*, 250:145-152.
- Kleczkowski L. A., Givan C. V., Hodgson J. M. und Randall D. D. (1988).** Subcellular Location of NADPH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase Activity in Leaf Protoplasts of *Pisum sativum* L. and Its Role in Photorespiratory Metabolism. *Plant Physiol.*, 88:1182-1185.
- Kleczkowski L. A. und Edwards G. E. (1989).** Identification of Hydroxypyruvate and Glyoxylate Reductases in Maize Leaves. *Plant Physiol.*, 91:278-286.
- Kleczkowski L. A., Randall D. D. und Edwards G. E. (1991).** Oxalate as a potent and selective inhibitor of spinach (*Spinacia oleracea*) leaf NADPH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Biochem. J.*, 276:125-127.
- Kochhar S., Hunziker P. E., Leong-Morgenthaler P. und Hottinger H. (1992).** Evolutionary relationship of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184:60-66.
- Kochhar S., Hunziker P. E., Leong-Morgenthaler P. und Hottinger H. (1992).** Primary Structure, Physicochemical Properties, and Chemical Modification of NAD⁺-dependent D-Lactate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 267:8499- 8513.

- Kohn L. D. und Jakoby W. B. (1968).** Tartaric Acid Metabolism. VII. Crystalline hydroxypyruvate reductase (D-glycerate dehydrogenase). *J. Biol. Chem.*, 243:2494-2499.
- Laber B., Maurer W., Scharf S., Stepusin K. und Schmidt F. S. (1999).** Vitamin B₆ biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Letters*, 449:45-48.
- Lämmli U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lamzin V. S., Dauter Z., Popov V. O., Harutyunyan E. H. und Wilson K. S. (1994).** High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, 236:759-785.
- Lamzin V. S. und Wilson K. S. (1993).** Automated refinement of protein models. *Acta Cryst.*, D49:129-149.
- Lasure A., Van Poel B., Pieters L., Claeys M., Gupta M., Vanden Berghe D. und Vlietinck A. J. (1994).** Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*. *Planta Med.*, 60:276-277.
- Lawrence, M. C. und Colman P. M. (1993).** Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, 234:946-950.
- Lebowitz R. J. (1985).** The Genetics and Breeding of *Coleus*. *Plant Breeding Reviews*, 3:343-360.
- Lichtarge O. (2001).** Getting past appearances: the many-fold consequences of remote homology. *Nature Structural Biology*, 8(11):918-920.
- Lindner E., Dohadwalla A. N. und Bhattacharya B. K. (1978).** Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohlii*: forskolin. *Arzneimittelforschung*, 28:284-289.
- Litvinenko V. I., Popova T. P., Simonjan A. V., Zoz I. G. und Sokolov V. S. (1975).** "Gerbstoffe" und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med.*, 27: 372-380.
- Lukhoba C. W., Simmonds M. S. J. und Alan J. P. (2006).** *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.*, 103:1-24.
- Ly T. N., Shimoyamada M. und Yamauchi R. (2006).** Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54(11):3786-3793.
- McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Storoni L. C. und Read R. J. (2005).** Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Cryst.*, D61:458-464.
- McPherson A. (1990).** Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.*, 189:1-23.

- Meinhard J., Petersen M., Alfermann A. W. (1992).** Purification of Hydroxyphenylpyruvate Reductase from Cell Cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.*, 1:598-599.
- Mizukami H. und Ellis B. E. (1991).** Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 10:321-324.
- Moran G. R. (2000).** 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433:117-128.
- Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. und Olson A. J. (1998).** Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.*, 19:1632-1662.
- Mulder N. J., Apweiler R., Attwood T. K., Bairoch A., Barrell D., Bateman A., Binns D., Biswas M., Bradley P., Bork P., Bucher P., Copley R. R., Courcelle E., Das U., Durbin R., Alquet L., Fleischmann W., Griffiths-Jones S., Haft D., Harte N., Hulo N., Kahn D., Kanapin A., Krestyaninova M., Lopez R., Letunic I., Lonsdale D., Silventoinen V., Orchard S. E., Pagni M., Peyruc D., Ponting C. P., Selengut J. D., Servant F., Sigrist C. J., Vaughan R. und Zdobnov E. M. (2003).** The InterPro database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucl. Acids Res.*, 31:315-318.
- Müller S. (2006).** Analytische Trennungen neuartiger Supramoleküle mittels HPLC. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Murray A. J. S., Blackwell R. D. und Lea P. J. (1989).** Metabolism of Hydroxypyruvate in a Mutant of Barley Lacking NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reduktase, an Important Photorespiratory Enzyme Activity. *Plant Physiol.*, 91:395-400.
- Navaza J. (1994).** AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.*, A50: 157-163.
- Parnham M. J. und Kesselring K. (1985).** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10:756-757.
- Pearson W. R. und Lipman D. J. (1988).** Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448.
- Pearson W. R. (1990).** Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA *Meth. Enzymol.*, 183:63-98.
- Pestka J. J. und Delwiche E. A. (1981).** 2-Phosphoglycerate phosphatase and serine biosynthesis in *Veillonella alcalescens*. *Can. J. Microbiol.*, 27(8):808-814.
- Petersen M. (1993).** Die Biosynthese und Akkumulation der Rosmarinsäure in Suspensionskulturen von *Coleus blumei* Benth.. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Petersen M., Häusler E., Karwatzki B. und Meinhard J. (1993).** Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta*, 189:10-14.
- Petersen M. (1994).** *Coleus* spp.: *In vitro* culture and the production of forskolin and rosmarinic acid, in: Y.P.S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants VI*, pp 69-92. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Petersen M. (1997).** Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry*, 45:1165-1172.
- Petersen M. und Alfermann A. W. (1988).** Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z. Naturforsch.*, 43c:501-504.
- Petersen M. und Simmonds M. S. J. (2003).** Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62:121-125.
- Popov V. O. und Lamzin V. S. (1994).** NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 301:625-643.
- Radaev S., Kattah M., Zou Z., Colonna M. und Sun P. D. (2002).** Making sense of the diverse ligand recognition by NKG2D. *J. Immunol.*, 169(11):6279-6285.
- Ravn H., Pedersen M.F., Andary J., Borum C., Anthoni U., Christophersen C. und Nielsen P.H. (1994).** Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, 40:51-61.
- Razeto A., Kochhar S., Hottinger H., Dauter M., Wilson K. S. und Lamzin V. S. (2002).** Domain Closure, Substrate Specificity and Catalysis of D-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Mol. Biol.*, 318:109-119.
- Razzaque A. und Ellis B. E. (1977).** Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta*, 137:287-291.
- Read R. J. (2001).** Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Cryst.*, D57:1373-1382.
- Satake T., Kamiya K., Saiki Y., Hama T., Fujimoto Y., Kitanaka S., Kimura Y., Uzawa J., Endang H. und Umar M. (1999).** Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 47:1444-1447.
- Sallach H. J. (1966).** D-Glycerate dehydrogenases of liver and spinach. *Meth. Enzymol.*, 9:221-368.
- Scarpati M. L. und Oriente G. (1958).** Isolamente e costituzione dell'acido rosmarinico (del *Rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, 28:2329-2333.
- Schuller D. J., Grant G. A. und Banaszak L. J. (1995).** The allosteric ligand site in the V_{max}-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nature Structural Biology*, 2:69-76.

- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch M. C. (2003).** SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31:3381-3385.
- Sheldrick G. M. und Schneider T. R. (1997).** SHELXL: High-resolution refinement. *Meth. Enzymol.*, 277B:319-343.
- Sheriff, S., Hendrickson W. A. und Smith J. L.. (1987).** Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 197:273-296.
- Slaughter J. C. und Davies D. D. (1968).** Inhibition of 3-phosphoglycerate dehydrogenase by L-serine. *Biochem. J.*, 109:749-755.
- Somerville C. R. (2001).** An Early Arabidopsis Demonstration. Resolving a Few Issues Concerning Photorespiration. *Plant Physiol.*, 125:20-24.
- Sonnhammer E. L. L., Eddy S. R. und Durbin R. (1997).** Pfam: A comprehensive database of protein families based on seed alignments. *Proteins*, 28:405-420.
- Stafford H. A., Magaldi A. und Vennesland B. (1954).** The enzymatic reduction of hydroxypyruvic acid to D-glyceric acid in higher plants. *J. Biol. Chem.*, 207:621-629.
- Stoll V. S., Kimber M. S. und Pai E. F. (1996).** Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase. *Structure*, 4:437-447.
- Sugimoto E. und Pizer L. I. (1968).** The Mechanism of End Product Inhibition of Serine Biosynthesis I. Purification and kinetics of phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 243(9):2081-2089.
- Szabo E., Thelen A. und Petersen M. (1999).** Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 18:485-489.
- Taguchi H. und Ohta T. (1991).** D-Lactate Dehydrogenase Is a Member of the D-Isomer-specific 2-Hydroxyacid Dehydrogenase Family. *J. Biol. Chem.*, 266:12588-12594.
- Takeda R., Hasegawa J. und Sinozaki M. (1990).** The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from nonvascular plants, Anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Lett.*, 31:4159-4162.
- Tambasco-Studart M., Titiz O., Raschle T., Forster G., Amrhein N. und Fitzpatrick T. B. (2005).** Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:13687-13692.
- Tanaka N., Nonaka T., Nakanishi M., Deyashiki Y., Hara A. und Mitsui Y. (1996).** Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, 4:33-45.
- Titus D. E., Hondred D. und Becker W. M. (1983).** Purification and Characterization of Hydroxypyruvate Reductase from Cucumber Cotyledons. *Plant Physiol.*, 72:402-408.

- Tolbert N. E. (1981).** Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 50:133-157.
- Trute A. und Nahrstedt A. (1996).** Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. *Phytochem. Anal.*, 7:204–208.
- Tsuruga A., Terasaka K., Kamiya K., Satake T. und Mizukami H. (2006).** Elicitor-induced activity of isorinic acid 3'-hydroxylase, an enzyme catalyzing the final step of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Biotechnology*, 23:297-301.
- Vagin A. und Teplyakov A. (1997).** MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of applied crystallography*, 30:1022-1025.
- Vinals, C., De Bolle, X., Depiereux, E. und Feytmans, E. (1995).** Knowledge based modelling of the D-lactate dehydrogenase threedimensional structure. *Proteins*, 21:307–318.
- Voskamp M. (2004).** Untersuchungen zur Sorption an Huminstoffen: Molekulargewicht und Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung. Dissertation, Universität Leipzig.
- Wagner S., Bernhardt A., Leuendorf J. E., Drewke C., Lytovchenko A., Mujahed N., Gurgui C., Frommer W. B., Leistner E., Fernie A. R. und Hellmann H. (2006).** Analysis of the *Arabidopsis* *rsr4-1/pdx1-3* Mutant Reveals the Critical Function of the PDX1 Protein Family in Metabolism, Development, and Vitamin B6 Biosynthesis. *Plant Cell*, 18:1722-1735.
- Westhead D. R., Slidel T. W., Flores T. P. und Thornton J. M. (1999).** Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Sci.*, 8(4):897-904.
- Yang Y., Zhao G., Man T.-K. und Winkler M. E. (1998).** Involvement of the *gapA*- and *epd* (*gapB*)-Encoded Dehydrogenases in Pyridoxal 5'-Phosphate Coenzyme Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 180:4294-4299.
- Yun Y. S., Satake M., Katsuki S. und Kunugi A. (2004).** Phenylpropanoid derivatives from edible canna, *Canna edulis*. *Phytochemistry*, 65:2167-2171.
- Zeltich I. (1955).** The isolation and action of crystalline glyoxylic acid reductase from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.*, 216: 553-576.

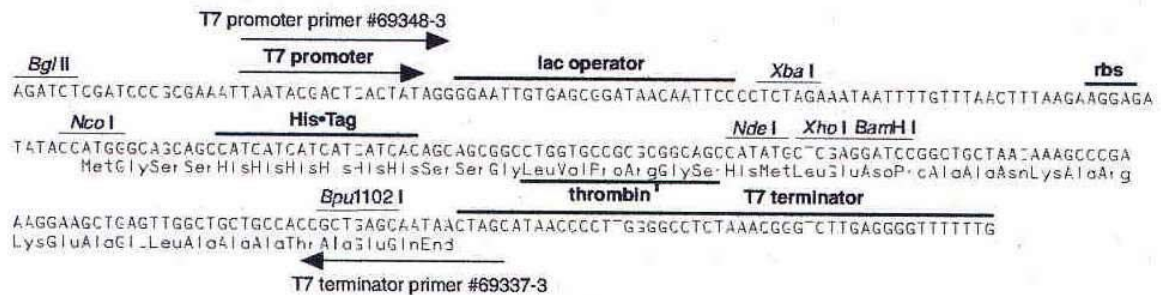
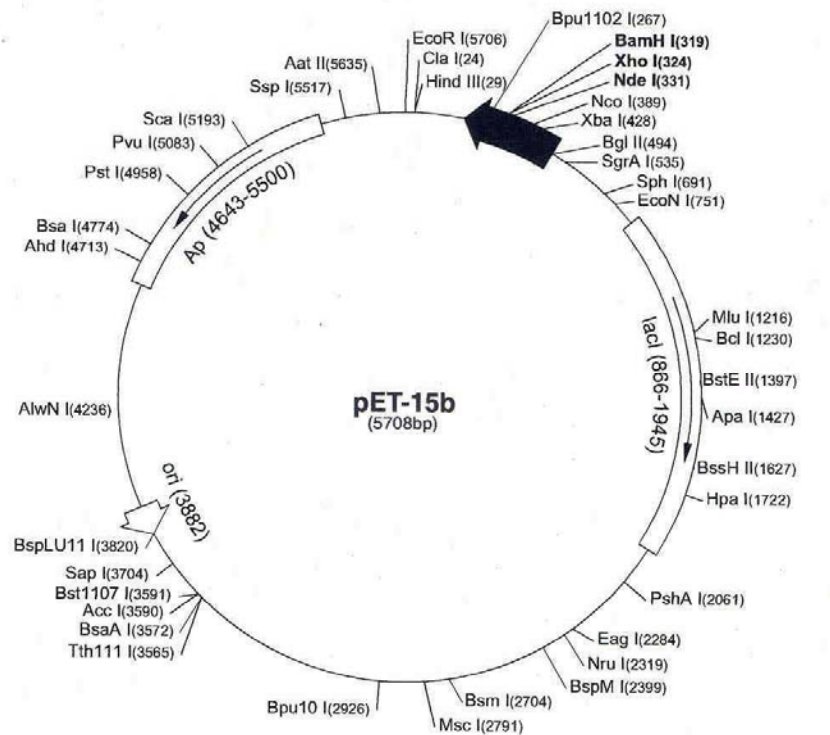
VIII Anhang

A Vektorkarten

A.1 pET-15b-Vektor

pET-15b sequence landmarks

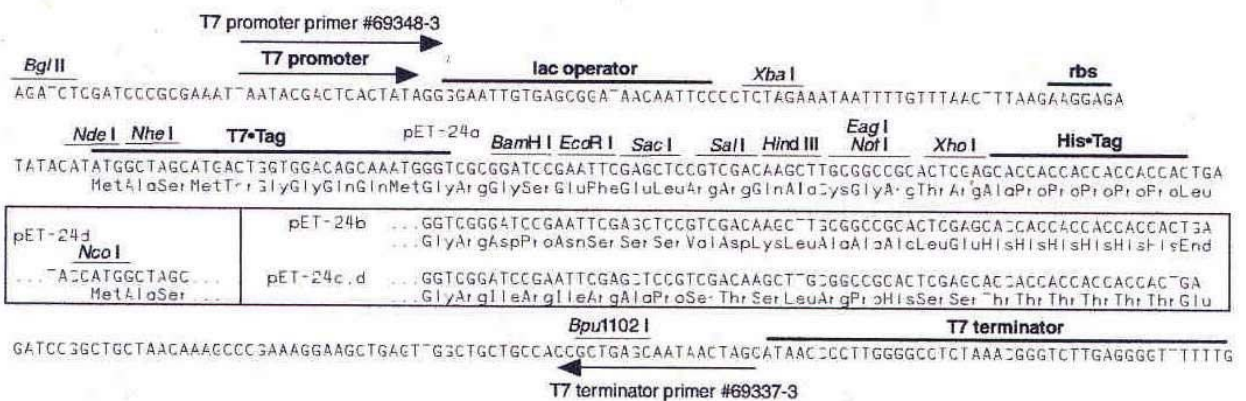
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His-Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



pET-15b cloning/expression region

pET-24a(+) sequence landmarks

The maps for pET-24b(+), pET-24c(+) and pET-24d(+) are the same as pET-24a(+) (shown) with the following exceptions: pET-24b(+) is a 5309bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24c(+) is a 5308bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24d(+) is a 5307bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-24c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-24c(+). As a result, *Nco* I cuts pET24d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-24a(+). *Nde* I does not cut pET-24d(+). Note also that *Sty* I is not unique in pET-24d(+).



<http://www.emdbiosciences.com/html/NVG/pETTable.html>

A.3 pGem[®]-T-Vektor

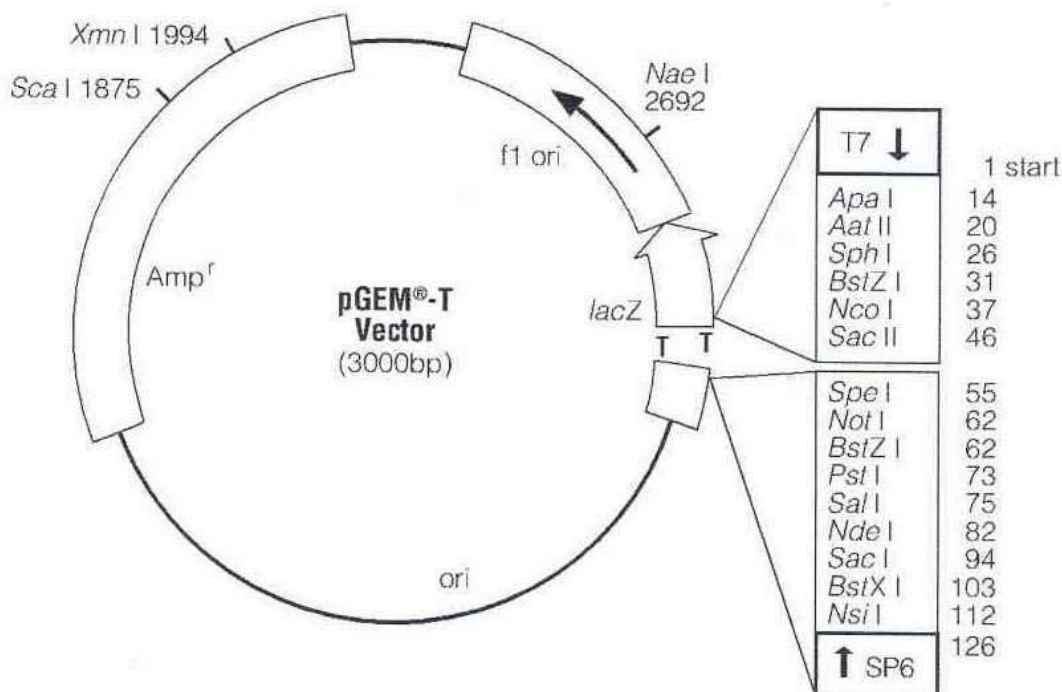


Figure 2. pGEM[®]-T Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Vector Sequence reference points:

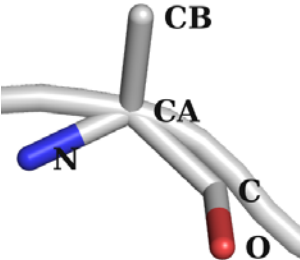
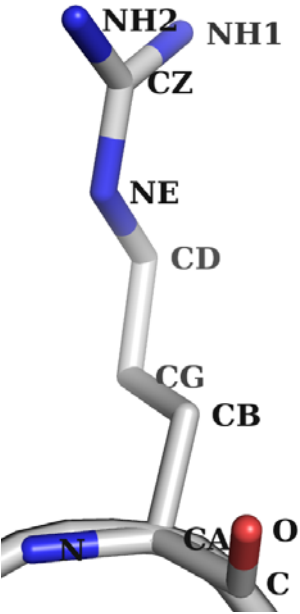
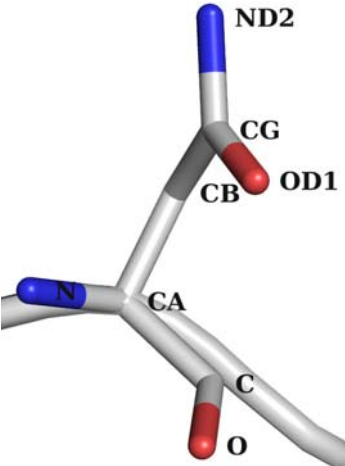
T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
multiple cloning region	10–113
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operon sequences	2821–2981, 151–380
<i>lac</i> operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2941–2957
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	161–177

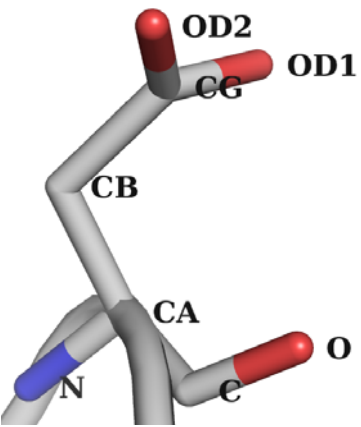
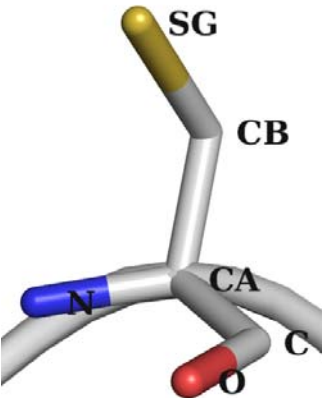
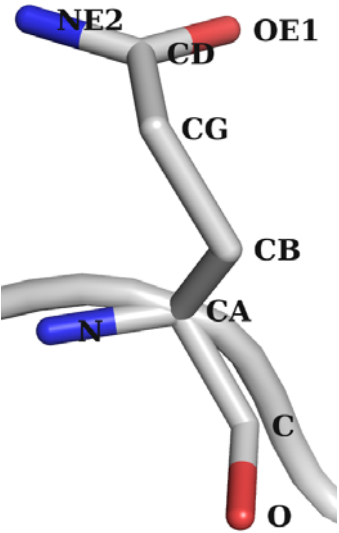
B Abkürzungen

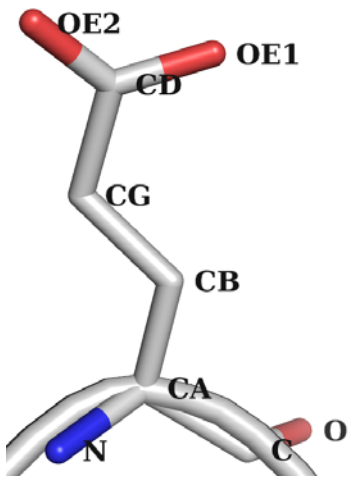

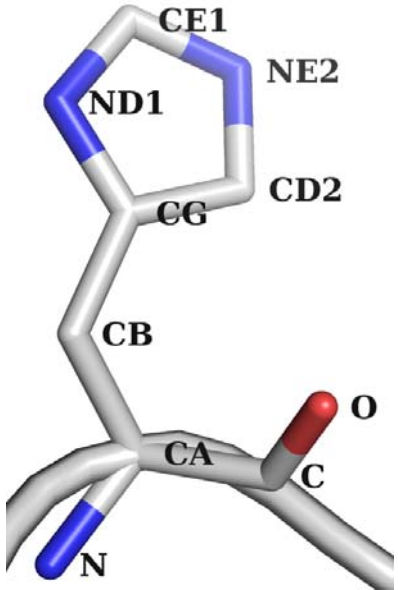
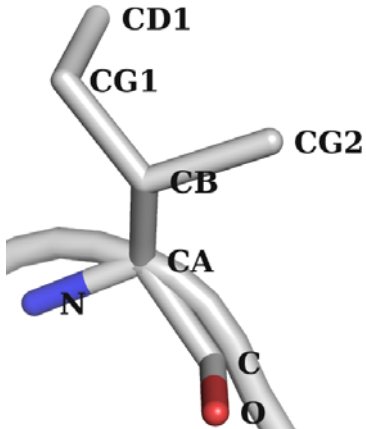
A	Absorption
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
bp	base pair / Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumin / Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
Da	Dalton
dem. Wasser	demineralisiertes Wasser
D-HicDH	D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase
DHPL	3,4-Dihydroxyphenyllaktat / 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure
DHPP	3,4-Dihydroxyphenylpyruvat / 3,4-Dihydroxyphenylbrenztraubensäure
D-LDH	D-Laktat Dehydrogenase
DNA	desoxyribonucleic acid / Desoxyribonucleinsäure (DNS)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ExPaSy	Expert Protein Analysis System
FDH	Formiat Dehydrogenase
GDH	D-Glycerat Dehydrogenase
GR	Glyoxylat Reduktase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPPR	Hydroxyphenylpyruvat Reduktase
HPR	Hydroxypyruvat Reduktase
iLDH	NAD-unabhängige Laktat Dehydrogenasen
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton

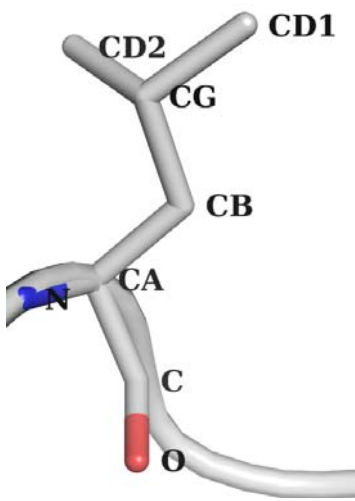
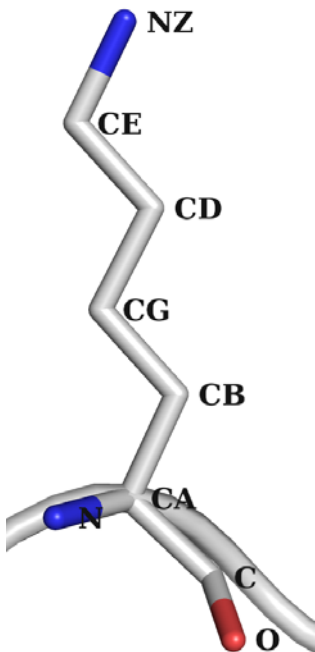
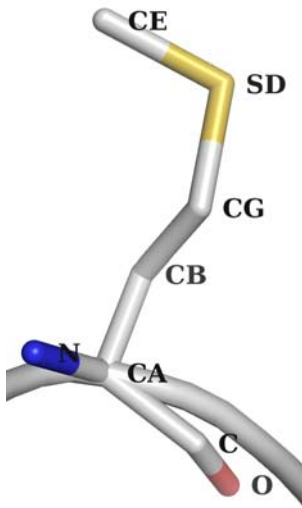
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
LDH	Laktat Dehydrogenase
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute(n)
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid, red.
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, red.
nLDH	NAD/NADP-abhängige Laktat Dehydrogenasen
p.a.	pro analysi; für die Analyse
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PGDH	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase
pHPL	4-Hydroxyphenyllaktat / 4-Hydroxyphenylmilchsäure
pHPP	4-Hydroxyphenylpyruvat / 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure
RMSD	Root Mean Squared Deviation / Durchschnittliche Standardabweichung
RNA	ribonucleic acid / Ribonucleinsäure
RS	Rosmarinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulphate / Natriumlaurylsulfat
Taps	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropansulfonsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

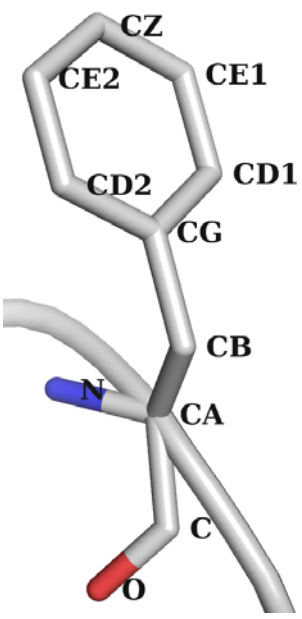
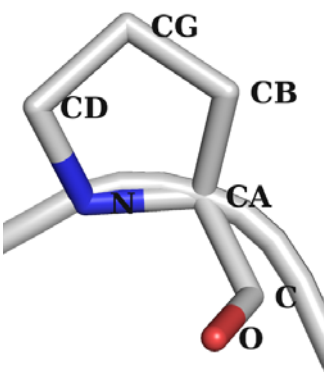
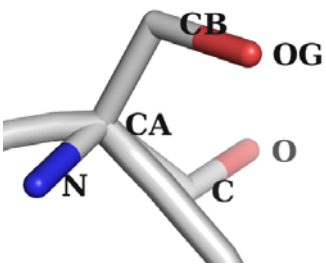
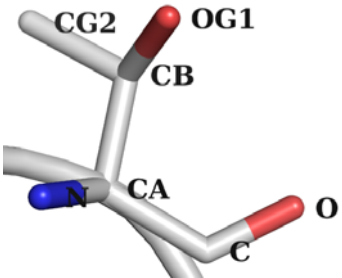
Dreibuchstaben- und Einbuchstaben-Abkürzungen für Aminosäuren

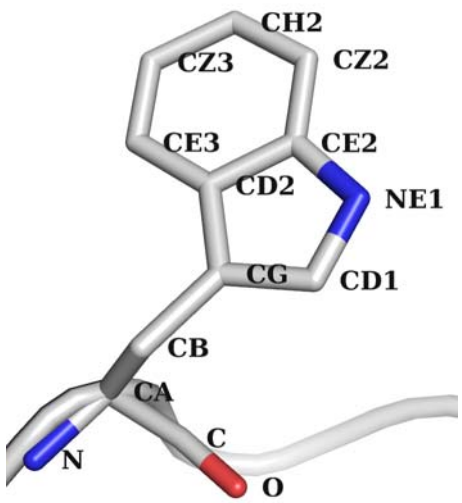
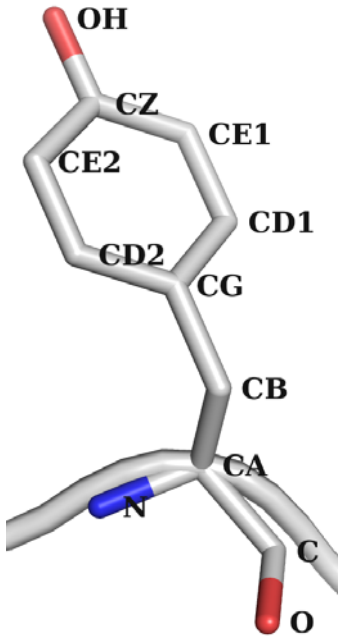
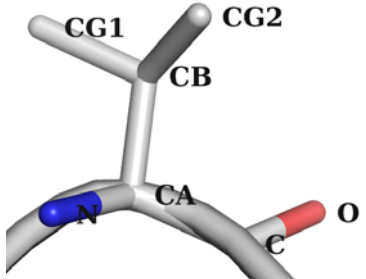
Aminosäure	Akürzung		Seitenkette	Struktur und Atombezeichnung
Alanin	Ala	A	unpolar	
Arginin	Arg	R	positiv geladen	
Asparagin	Asn	N	ungeladen, polar	

Asparaginsäure	Asp	D	negativ geladen	
Cystein	Cys	C	ungeladen, polar	
Glutamin	Gln	Q	ungeladen, polar	

Glutaminsäure	Glu	E	negativ geladen	
Glycin	Gly	G	unpolar	
Histidin	His	H	positiv geladen	
Isoleucin	Ile	I	unpolar	

Leucin	Leu	L	unpolar	
Lysin	Lys	K	positiv geladen	
Methionin	Met	M	unpolar	

Phenylalanin	Phe	F	unpolar	
Prolin	Pro	P	unpolar	
Serin	Ser	S	ungeladen, polar	
Threonin	Thr	T	ungeladen, polar	

Tryptophan	Trp	W	unpolar	
Tyrosin	Tyr	Y	ungeladen, polar	
Valin	Val	V	unpolar	

C Definitionen

Wörter, die verwendet wurden, aber nicht im Duden im Sinne dieser Arbeit erklärt werden.

Ali|**li**quot, das; -s, -s Ein Teil einer in gleiche Teile aufgeteilten Menge; **a**li|**li**quo|**tie**|**ren**

an imp fen	Überführen von Bakterien in steriles Medium, um diese zu vermehren.
ap pa rent	(Französisch, Englisch): offenbar, scheinbar, anscheinend
Ä qui li brie rung , die; -, -en	Die Einstellung eines Gleichgewichtes z.B. bei Lösungen; ä qui li brie ren
Beam line , die; -, -s	Vermessungsstation beim Synchrotron, in der Wissenschaftler Zugang zur Synchrotronstrahlung bekommen. Die hochenergetische Strahlung wird gebündelt in einer spezifischen Wellenlänge zur Vermessungsstation geleitet.
cha o trop	Bezeichnung für die Eigenschaft von Substanzen, die regelmäßige - auf der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruhende - Struktur von flüssigem Wasser zu zerstören. Chaotrope Stoffe stabilisieren die Konformation von Makromolekülen, indem sie die Bildung der zur Solvation notwendigen H ₂ O-Käfigstrukturen verhindern.
Clus ter , der; -s, -	Anhäufung oder Gruppe
E lu tion , die; -, -en	syn: Eluierung, bezeichnet das Ab- oder Herauslösen von Stoffen, z.B. von Säulen. Das Ergebnis bezeichnet man als E lu at ; e lu ie ren
hy dro dy na mi scher Ra di us	der Radius einer hypothetischen festen Kugel, die in einem Lösungsmittel die selben Diffusionseigenschaften besitzt, wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Teilchen. Er hängt von der Form eines Teilchens sowie den umgebenden Lösungsmittelmolekülen ab.
In hi bi tor , der; -s, -en	Hemmstoff. Eine Substanz, die eine Reaktion verlangsamt oder verhindert; in hi bie ren
In ku ba tion , die; -, -en	Einwirken lassen z.B. von Enzymen auf ein Substrat oder eine Substanz; in ku bie ren
In sert , das; -s, -s	DNA-Fragment, das in einen → <i>Vektor</i> eingefügt wird.
kom pe tent	(Bakterien-) Zellen, die zur Aufnahme von → <i>Vektoren</i> befähigt sind.
Loop , der, -s, -s	Zum Aufnehmen eines Kristalls und Platzieren im Röntgenstrahl. Bestehend aus einem Metallstift mit einer kleinen Schlinge.
Me di um , das, -s, -ien	Flüssige oder feste Nährlösung. Zum Vermehren von Bakterien

	oder Zellen mit für den Organismus lebensnotwendigen Nährstoffen
O pe ron , das; -s, -	Eine Gruppe von Genen auf der DNA, die zusammen transkribiert werden.
Pel let , das; -s, -s	Ein durch Zentrifugation entstandener Körper aus gepresstem Material am Boden des Zentrifugationsgefäßes; pel let ie ren
pros the ti sche Grup pe , die; -, -en	Ein an Protein (Enzym) kovalent gebundener Nichtproteinanteil, der an der katalytischen Aktivität beteiligt ist.
Puf fer , der; -s, -	Chemische Substanz oder Lösung zur Konstanthaltung des pH-Wertes); um puf fern : Austauschen den Puffers.
Re dun danz , die; -, -en	Mehrfaches Vorkommen ein und derselben Information oder desselben Objektes, z.B. eines Signals.
Star-Ak ti vi tät , die, -, -en	Reduzierte Spezifität eines Restriktionsenzym. Zeichnet sich dadurch aus, dass es unter bestimmten Voraussetzungen DNA an anderen, ähnlichen Basen-Sequenzen schneidet, als den vorgesehenen Erkennungssequenzen.
Tem plat ; das; -s, -s	Für die Nukleinsäure-Vervielfältigung vorgesehener RNA- oder DNA-Strang.
Vek tor , der; -s, -en	Kleine ringförmige DNA, die sich in einer Zelle autonom replizieren kann und mit dessen Hilfe Fremd-DNA in eine Zelle eingeschleust werden kann.
Vi ta mer , das; -s, -e	Bezeichnet eine von mehreren chemisch verwandten Substanzen, die die gleiche Vitaminfunktion ausüben.
Vor tex er , der; -s, -	Laborumgangssprachlicher Begriff für einen elektrischen Vermischer; vor tex en

D Geräteliste

FPLC

Waters 650 Advanced Protein Purification System	Waters, Eschborn
Waters 600 Multisolvant Delivery System	
Model 2150 Peak Separator	
Waters 484 Tunable Absorbance Detector	
Linseis Schreiber L6512	Linseis
LKB Pump P500 und LKB Frac 100	Pharmacia

HPLC

HPLC Pump 422	Kontron Instruments, Neufahrn
Detector 430A	
Integrationssoftware: PC Integration Peak/2	
HPLC Pumpe L-6000	Merck
LDC-Analytical spectroMonitor 3200	
Chromato-Integrator D-2500	

Zentrifugen

Sorvall RC 50 Plus	DuPont, Newton, USA
Biofuge 17RS	Heraeus Sepatech, Osterode
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Sigma 3K 30	Braun Biotech, Melsungen

UV-Photometer

UVIKON Spectrophotometer 930	Kontron Instruments, Neufahrn
------------------------------	-------------------------------

PCR-Geräte

Stratagene RoboCycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Eppendorf PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg

pH-Meter

Fisher Scientific Accumet Basic	Fisher Scientific, Nidderau
---------------------------------	-----------------------------

Ultraschallgeräte

UP 200S Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
------------------------------	----------------------------

E Chemikalienliste

3,4-Dihydroxyphenyllaktat	Aus enzymatischer Hydrolyse von Rosmarinsäure
3,4-Dihydroxyphenylpyruvat	synthetisiert von Dr. Nagaraj Rao (Forschungszentrum Jülich)
4-Hydroxy-3-methoxyphenylpyruvat (HMPP)	KMF
4-Hydroxyphenyllaktat (pHPL)	Sigma, Deisenhofen

4-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP)	Sigma-Deisenhofen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (x-Gal)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Eisessig	KMF Applichem
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glyoxylat	Fluka
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Duchefa, Haarlem oder Roth, Karlsruhe
Hydroxypyruvat (HP)	Fluka
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Appli Chem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Merck
Methanol p.a.	unterschiedliche Quellen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol, Hamburg
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumsarcosinat	Sigma, Deisenhofen
Nicotinamid Adenin Dinucleotid, red. (NADH)	Biomol
Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat, red. (NADPH)	Biomol
o-Phosphorsäure 85%	Riedel de Haen
Oxoisocaproat (OIC)	Fluka
Phenyllaktat (PL)	Sigma
Phenylpyruvat (PP)	Fluka
Polyethylenglykol (PEG) 1000	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme:	
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
<i>Nco</i> I	MBI Fermentas
<i>Nde</i> I	MBI Fermentas
<i>Sal</i> I	MBI Fermentas
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau Professor Dr. Maike Petersen, für die Überlassung des interessanten Themas, die außerordentlich gute Betreuung und Unterstützung und dafür, dass sie immer für ihr Team da war.

Herrn Dr. Andreas Heine, für seine großartige Betreuung meiner kristallographischen Arbeiten und seiner immerwegs gedulden und verständnisvollen Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Gerhard Klebe, für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Unterstützung meiner kristallographischen Arbeiten.

Herrn Professor Dr. Michael Keusgen, für die Bereitstellung seines Photometers und die gute Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Uwe Linne und Frau Dr. Laufenberg, für die Durchführung von NMR Analysen zur Bestimmung der Reinheit einiger meiner Substanzen.

Allen aus meiner Arbeitsgruppe. Besonders Dr. Stefan Kuhlmann, der mir am Anfang meiner Doktorarbeit viele Arbeitsmethoden beigebracht hat, Dr. Kerstin Kranz und Herrn David Eberle, für die gute Zeit und Zusammenarbeit im Labor und Frau Anna Berim für ihre aufopfernde Hilfe und gute Zusammenarbeit.

Allen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Ulrich Matern und Herrn Professor Gerhard Klebe für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Kisser-Nonn für ihre immer aufmunternde Art als gute Seele des Instituts für Pharmazeutische Biologie.

Herrn Schott, für seine schnelle und zuverlässige Hilfe bei vielen elektronischen und technischen Problemen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester Carmen dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

DANKE!

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Charakterisierung und Struktur einer Hydroxy(phenyl)pyruvat
Reduktase aus *Coleus blumei*“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

London, den 08.11.2007

.....
(Verena Janiak)